

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
MARIANNA BOIA FERREIRA

ESTUDO DO PAPEL BIOLÓGICO DA PROTEÍNA TCTP (*Translationally  
Controlled Tumor Protein*)

CURITIBA  
2018

MARIANNA BOIA FERREIRA

ESTUDO DO PAPEL BIOLÓGICO DA PROTEÍNA TCTP (*Translationally  
Controlled Tumor Protein*)

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de  
Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular,  
Departamento de Biologia Celular, Setor de  
Ciências Biológicas, Universidade Federal do  
Paraná, como critério para obtenção de título.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Andrea Senff Ribeiro

Co-orientador: Prof. Dr. Silvio Sanches Veiga

CURITIBA

2018

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.  
Biblioteca de Ciências Biológicas.  
(Giana Mara Seniski Silva – CRB/9 1408)

Ferreira, Mariana Bóia

Estudo do papel biológico da proteína TCTP (*Translationally Controlled Tumor Protein*). / Mariana Bóia Ferreira. – Curitiba, 2018.  
145 p.: il.

Orientadora: Andrea Senff Ribeiro  
Coorientador Silvio Sanches Veig

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

1. Proteínas 2. Toxinas 3. Melanoma 4. Aranha - veneno 5. Histamina I. Título II. Ribeiro, Andrea Senff III. Veiga, Silvio Sanches, 1962, - IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

CDD (22. ed.) 572.6



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO BIOLOGIA CELULAR E  
MOLECULAR

## TERMO DE APROVAÇÃO


Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **MARIANNA BOIA FERREIRA** intitulada: **ESTUDO DO PAPEL BIOLÓGICO DA PROTEÍNA TCTP (*Translationally Controlled Tumor Protein*)**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua Aprovação no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 26 de Outubro de 2018.



ANDREA SENFF RIBEIRO  
Presidente da Banca Examinadora



SHEILA MARIA BROCHADO WINNISCHOFER  
Avaliador Interno



RUBENS BERTAZOLLI FILHO  
Avaliador Externo



KATIA SABRINA PALUDO  
Avaliador Externo



FRANCISCO FILIPAK NETO  
Avaliador Interno



Ao meu amor Thiago e aos  
meus pedacinhos Maria Júlia,  
Joaquim e Benjamin.

À minha amiga e orientadora,  
as vezes meio mãe, Andrea Senff  
Ribeiro.

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus por estar sempre presente, abençoando e iluminando meus caminhos.

Aos meus filhos por terem me mostrado o verdadeiro sentido da vida. Maria Júlia meu pedacinho de céu, Joaquim o tão esperado e Benjamin meu presente de Deus. Amo muito vocês, desculpem minha ausência e muito obrigada por todo apoio.

Ao meu marido Thiago pelo amor, apoio, paciência, interesse e compreensão. Obrigada pelos nossos filhos! Amo você tudo!

À minha mãe por toda dedicação na criação de seus filhos. Por possibilitar que eu finalizasse esse trabalho da forma mais tranquila possível. Muito obrigada pelo seu tempo. Agradeço por todos ensinamentos, pela educação, pelos princípios, pelo apoio e pela cumplicidade. Não tenho palavras para expressar o quanto me orgulho em ser sua filha.

Ao meu irmão Alexandre por todo seu amor, cumplicidade e apoio. Por estar sempre ao meu lado. Você é meu orgulho! Amo você mais que tudo.

Aos meus avós, Wilson da Silva Boia (em memória) e Ana da Silva Boia obrigada por todo apoio e exemplo. Cada dia de estudo é reflexo da educação e do exemplo dados pelo meu avô. Sinto muito sua falta, agradeço por toda proteção e amor. Sei que de algum lugar você ainda guia meus caminhos. A minha avó por todo amor, paciência e carinho, meu exemplo de força e coragem.

Às minhas mães Zeloí Vieira dos Santos (Zeli) e Regina do Rocio Pereira (Re) por todo apoio e amor. Zeli obrigada por cuidar de mim desde que eu era pequenininha, por cuidar dos meus filhos, pela educação, pelo estímulo, pelo ombro amigo, por estar sempre do meu lado. À Re, minha madrinha, por todo seu amor, estímulo e carinho, pelos momentos alegres, por sempre estar disposta a me ajudar, por cuidar de todos aqui, pelos momentos em família. Amo muito vocês, não teria chegado aqui sem ajuda de vocês.

À minha orientadora Dr<sup>a</sup> Andrea Senff Ribeiro por TODO apoio, pelos ensinamentos, pela confiança, pela cumplicidade, pelos momentos de descontração. Você é um exemplo como mulher e cientista. Tenho muito orgulho de ter sua amizade e ser sua aluna.

Ao meu co-orientador e professor Dr. Silvio Sanches Veiga, por abrir as portas do seu laboratório a mim e por confiar no meu trabalho. Obrigada pelas discussões científicas, pelos ensinamentos de vida, pelas ideias e pela amizade. Você é um exemplo de dedicação à ciência.

À Dr<sup>a</sup>. Olga Meiri Chaim pelo exemplo de dedicação ao trabalho e à ciência. Pelas discussões científicas, pelo apoio durante a realização desse trabalho. Obrigada pelo apoio emocional e financeiro para a minha formação. Agradeço pela amizade e cumplicidade, sem a sua ajuda esse trabalho não seria possível. Você é um exemplo de amor à ciência e à família.

À Dr<sup>a</sup> Luiza Helena Gremski por todos os ensinamentos, pelo apoio na realização desse trabalho, por suas correções e pela disposição em ajudar todos os alunos. Você fez grande parte da minha formação. Obrigada pela amizade e carinho.

À Aline Viana Bednaski por toda sua ajuda profissional e pessoal. Por estar sempre disposta a me ouvir e ajudar. Você é amiga para todas as horas. Agradeço todos os dias por fazer parte da minha vida e possibilitar que eu fizesse parte da sua e de sua família.

Ao Fernando Matsubara meu querido amigo e colega. Obrigada pela ajuda na realização desse trabalho, nas discussões científicas, na realização dos experimentos. Pela companhia e pela paciência, por estar sempre disposto a me ajudar e ouvir. Pelos conselhos, pelo ombro amigo, pelo carinho, pelas risadas, pelas comilanças, pelas fotografias. Você é um exemplo de seriedade e profissionalismo.

Aos colegas do LME Dilza Trevisan Silva, Gabriel Otto Meissner, Adriano Marcelo Morgon, Larissa Viutika, Hanna Câmara Justa, Elidiana de Bona, Thaís Pereira, Zelinda Schemczssen, Bruno Antunes, Rodrigo Zarungner, Nayanne Polli, Pedro Henrique de Caires Schluga, Ana Maria Melo, Fernando Jacomini (Sorocaba) e Raíza Stea Vieira Rança obrigada por estarem sempre dispostos a ajudar. Agradeço pela amizade e carinho, pelos momentos de descontração, pelas risadas. Obrigada por me aguentarem e me

acalmarem sempre. Só tenho a agradecer a oportunidade pessoal e profissional de conviver com cada um de vocês.

Em especial a Antoniele Beatiz Baldissera e Vanessa Ribeiro por toda ajuda, pelo companheirismo, pela amizade e carinho. Anto obrigada por sempre estar ao meu lado, por sempre estar disposta a me ouvir. Obrigada por toda confiança e toda ajuda na realização desse trabalho. Nessa obrigada pela amizade, pelas risadas, por ser verdadeira e sempre me ajudar a ser alguém melhor. Obrigada por toda ajuda com as crianças. Obrigada por me aguentar e ouvir todas as minhas reclamações. Só tenho a agradecer por vocês me deixar fazer parte de suas vidas.

Em especial a minha iniciação científica Kamila Graudin Moreno. Agradeço por tornar os meus dias mais alegres, por toda ajuda na execução dos experimentos. Obrigada pelas risadas, pelas conversas, pelas gordices. Por aturar meu mau humor e esse meu jeitinho delicado. Sinto não ser uma orientadora melhor. Obrigada pela amizade e carinho.

Às iniciações científicas que dividiram seu tempo comigo, Priscila Fernanda Vieira, Maria Júlia Chiquito Mendes e Amanda Savariego. Esse trabalho também é de vocês. Obrigada por toda ajuda na execução dos experimentos, pelas discussões científicas, por toda amizade e carinho. Vocês me fizeram aprender muito, orientar todas vocês com certeza foi uma das partes mais difíceis do meu doutorado.

Em especial a minha eterna IC Alana Beatriz Coelho Basílio, obrigada por tudo. Minha dívida e agradecimento a você são maiores do que qualquer palavra que eu possa escrever aqui. Obrigada por tratar do meu trabalho como se fosse seu, por toda ajuda na execução dos experimentos, por todas as noites no laboratório, horas na biblioteca, comilanças, pelo ombro amigo, pela amizade, pelo carinho, por cuidar tão bem dos meus filhos. Por ter aceitado não somente dividir essa jornada de trabalho como também a criação dos meninos. Só tenho a agradecer por você me deixar fazer parte de sua vida e de sua família.

Às colegas Yvanna Carla Souza Salgado, Halina Doria e Audrey Tanhoffer por permitirem que eu fizesse parte da vida e do trabalho de vocês. Obrigada pela amizade, pelas risadas, pelas discussões científicas, pelo

carinho. Por permitir que eu pudesse dividir um pouco do pouco que sei com vocês e confiarem no meu trabalho. Essa oportunidade me fez aprender muito.

Ao Cléber Rafael Vieira da Costa pelo auxílio nos experimentos *in vivo* e confecção das lâminas dos tumores. Obrigada pela amizade, pelas caronas e pelos momentos de descontração.

À Dr<sup>a</sup> Márcia Helena Appel por estar sempre disposta a me ajudar e ouvir, obrigada pela amizade e carinho. Você é um exemplo de persistência e amor à ciência.

À Dr<sup>a</sup> Kátia Barbaro pela doação dos inibidores.

À Dr<sup>a</sup> Maria Célia Jamour pela doação da linhagem RBL-2H3.

À Dr<sup>a</sup> Ana Carolina Martins Wille pelo processamento das peles dos coelhos. Por toda a preocupação e ajuda. Obrigada pela amizade e carinho.

À Dr<sup>a</sup> Lucélia Donatti pelas discussões científicas, pela ajuda na execução de experimentos e pelos momentos de descontração.

Ao Dr. Michel Otuki pelas discussões científicas e ajuda com o artigo.

Ao Dr. Marcelo Lima pelo empréstimo do fotodocumentador.

Aos professores Dr. Edvaldo da Silva Trindade e Dr. Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro pelos animais e pelas discussões científicas.

Aos Dr<sup>a</sup> Sheila Maria Brochado Winnischofer e Dr. Rubens Bertazzoli Filho pelas correções dos relatórios e por todos os comentários e discussões pertinentes. E principalmente por aceitarem fazer parte da banca desse trabalho.

À Dr<sup>a</sup> Katia Sabrina Paludo por aceitar fazer parte da banca desse trabalho. Por todas as discussões. Se hoje finalizo essa etapa posso dizer que você foi um grande exemplo.

Ao Dr Francisco Filipak Neto por aceitar fazer parte da banca desse trabalho. Por toda ajuda sempre que solicitada.

À Zaine Lyra por dividir comigo a responsabilidade da representação dissente. Pelos momentos de discussão e descontração.

Aos meus queridos amigos Gabriela Sbeghen, Tiago Marchet, Beatriz Gertz, Bianca Bortoluzzi Correa, Adriane Follador, Alessandra Hamasaki, Rayana Kaminski, Juliana Teodoro, Felipe Sobczynski, Roberta Molina Soares Buzignani, Felipe Buzignani, Tamires Correa, Kamila Meger pela amizade,

carinho e apoio. Obrigada pela confiança, pelas risadas e pelos momentos de descontração. Amo todos vocês.

Aos coordenadores do programa Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro, Andrea Senff Ribeiro e Francisco Filipak Neto e secretário do programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular Lucas Menezes.

Aos membros do colegiado do ano de 2016 Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro, Edvaldo da Silva Trindade, Andrea Senff Ribeiro, Daniela Pavoni, Fernando Mazzilli Louzada, Francisco Filipak Neto, Lia Nakao. Por todas as discussões científicas e políticas. Com certeza fazer parte do colegiado acrescentou muito na minha formação.

Ao Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológico por ceder o espaço para realização dos experimentos com coelhos. E em especial ao Bruno por todo auxílio nos experimentos de dermonecrose.

À CAPES, Fundação Araucária, FAPESP, SETI, CNPq e familiares pelo apoio financeiro.

À todos que de alguma forma contribuíram para o meu trabalho.

“Um homem precisa viajar. Por sua conta, não por meio de histórias, imagens, livros ou TV. Precisa viajar por si, com seus olhos e pés, para entender o que é seu. Para um dia plantar as suas árvores e dar-lhes valor. Conhecer o frio para desfrutar o calor. E o oposto. Sentir a distância e o desabrigo para estar bem sob o próprio teto. Um homem precisa viajar para lugares que não conhece para quebrar essa arrogância que nos faz ver o mundo como o imaginamos, e não simplesmente como é ou pode ser; que nos faz professores e doutores do que não vimos, quando deveríamos ser alunos, e simplesmente ir ver.”

(AMYR KLINK, 2000.)



## RESUMO

A TCTP (*Translationally Controlled Tumor Protein*) é uma proteína multifuncional expressa em diversos organismos e tecidos. Diferentes estudos já estabeleceram seu envolvimento na malignidade, reversão tumoral e apoptose. Além disso, em ambiente extracelular, ela atua como um fator de liberação de histamina (*HRF*). Esse trabalho é organizado em dois capítulos, o primeiro refere-se ao estudo da TCTP no processo de reversão tumoral em melanoma murino e humano. A atividade antitumoral da sertralina (droga que atua reduzindo os níveis proteicos da TCTP) foi avaliada e comparada à dacarbazina (quimioterápico de escolha no tratamento clínico do melanoma). Nossos resultados demonstram que a sertralina reduz os níveis proteicos da TCTP, além de aumentar os níveis intracelulares da P53 em células de melanoma. As células tratadas com sertralina reduziram a viabilidade celular, migração celular e a capacidade de gerar colônias em meio semi-sólido; mesmo após a remoção do tratamento o efeito foi mantido. Essas alterações sugerem uma complexa reprogramação celular desencadeada pela sertralina e acompanhada da redução da TCTP. Em ensaio *in vivo*, avaliando o uso da sertralina combinada ou não à dacarbazina, podemos observar que a sertralina é capaz de inibir a formação tumoral, sendo essa inibição superior a dacarbazina isolada. Além disso, o uso concomitante de sertralina e dacarbazina apresentou maior inibição do que os fármacos isolados. Analisando as biópsias dos tumores, observamos redução dos níveis da TCTP. Enquanto o tratamento com dacarbazina leva a um aumento da P53, com aumento da TCTP. Além disso, podemos observar uma redução da Ki67 e aumento da Caspase 3 nas biópsias dos animais tratados com sertralina. Esses resultados corroboram nossos dados anteriores e a literatura que relaciona altos níveis da TCTP com tumores agressivos, além de apontar a TCTP como uma proteína alvo para o estudo da reversão tumoral em linhagens de melanoma. No segundo capítulo deste trabalho descrevemos os estudos da caracterização da TCTP de aranha-marrom *Loxosceles intermedia* (LiTCTP) como fator de liberação de histamina. Nossos resultados mostram que a LiRecTCTP é capaz de degranular basófilos e assim gerar aumento da atividade  $\beta$ -hexosaminidase. A LiRecTCTP gera um aumento do influxo de cálcio nas células concentração dependente e também aumenta a expressão de IL-3 e IL-4. Essa toxina foi capaz de aumentar a permeabilidade vascular e gerar edema de pata em camundongos. Quando os animais são tratados com antagonistas de receptores histaminérgicos e de degranulação de mastócitos podemos observar uma alteração na permeabilidade e na formação de edema. O cromoglicato (inibidor de degranulação) é capaz de inibir os efeitos de LiRecTCTP tanto *in vivo* quanto *in vitro*, porém a cimetidina, antagonista de receptos H2 (presente principalmente nas células da mucosa intestinal) não interfere significativamente nos efeitos da histamina liberada pela LiRecTCTP. Além disso, podemos observar que a LiTCTP está relacionada ao processo inflamatório decorrente do loxoscelismo, pois esta atuou aumentando o extravasamento de líquido intersticial e o edema e *in vivo*. Esses dados corroboram a literatura e confirmam que a LiTCTP libera histamina *in vivo*. Dessa forma podemos melhor compreender a TCTP na malignidade e tumorigênese do melanoma e como um fator de liberação de histamina.

Palavras chaves: TCTP, reversão tumoral, melanoma, loxoscelismo, aranha-marrom, histamina.

## ABSTRACT

Translationally Controlled Tumor Protein (TCTP) is a multifunctional protein expressed in various organisms and tissues. Different studies have already established TCTP involvement in malignancy, tumor reversion and apoptosis. In addition, in the extracellular environment, it acts as a histamine releasing factor (HRF). This work is organized in two chapters; the first refers to the study of TCTP in the process of tumor reversion in murine and human melanoma. The antitumor activity of sertraline (a drug that act by reducing protein levels of TCTP) has been evaluated and compared to dacarbazine (chemotherapy used in the clinical treatment of melanoma). Our results demonstrate that sertraline reduces protein levels of TCTP, in addition to increasing an intracellular levels of P53 in melanoma cells. Cells treated with sertraline reduced cell viability, cell migration and the ability to generate colonies in soft-agar, even after the treatment was removed for 5 days. These changes suggest a complex cellular reprogramming triggered by sertraline and accompanied by the reduction of TCTP. In the *in vivo* assay, the use of sertraline combined or not with dacarbazine was evaluated, we can observed that sertraline is able to inhibit tumor formation, this inhibition was stronger than the observed for dacarbazine alone. In addition, the concomitant use of sertraline and dacarbazine showed better results than the inhibition obtained by each drug alone. Analyzing the biopsies, we observed reduction of TCTP levels in tumors. While treatment with dacarbazine leads to an increase of P53, with increase of TCTP. In addition, we can observe a reduction of Ki67 and increase of caspase 3 in the biopsies of animals treated with sertraline. These results corroborate our previous data and the literature that relate high levels of TCTP with aggressive tumors, besides they point TCTP as a target protein for the study of tumor reversion in melanoma cell lines. At the second chapter of this work, we describe the characterization studies of the brown spider TCTP *Loxosceles intermedia* (LiTCTP) as a histamine releasing factor. Our results show that LiRecTCTP is able to degranulate basophils and thus generate increased  $\beta$ -hexosaminidase activity. LiRecTCTP triggers an increase of calcium influx in the cells, in concentration-dependent manner and also increases the expression of IL-3 and IL-4. This toxin was able to increase vascular permeability and generate paw edema in mice. When animals are treated with histaminergic receptor antagonists and mast cell degranulation inhibitor, a change in permeability and formation of edema can be observed. Chromolyn (degranulation inhibitor) is able to inhibit the effects of LiRecTCTP *in vivo* and *in vitro*, but cimetidine, H2 receptor antagonist, (H2 is present mainly in intestinal mucosal cells) does not significantly interfere with the effects of LiRecTCTP. In addition, we show that LiTCTP is related to the inflammatory process in loxoscelism, LiRecTCTP increase the extravasation of interstitial fluid and promotes edema *in vivo*. These data corroborate the literature and the inhibition obtained by histamine antagonists confirm that LiTCTP triggers the release of histamine *in vivo*. In this way, our results provide meaningful information which helps to better understand the role of TCTP in melanoma malignancy and tumorigenesis and as a histamine releasing factor.

**Key words:** TCTP, tumor reversion, melanoma, loxoscelism, brown spider, histamine.

## LISTA DE ABREVIATURAS

A2058- linhagem celular de melanoma humano metastático

Apaf- Fator de ativação de apoptose 1

Araf- *Serine/threonine-protein kinase A-Raf*

B16F1- linhagem celular de melanoma murino F1

B16F10- linhagem celular de melanoma murino F10

BAX- *BCL2 Associated X*

*BCLXL- B-cell lymphoma-extra large*

BRAF- *Serine/threonine-protein kinase B-raf*

Chrf- *cardiac hypertrophy related factor*

CDC2- quinase dependente de ciclina 2

CDKN2A- inibidor de quinase dependente de ciclina 2A

CDK4- quinase dependente de ciclina 4

Craf- protooncogene

DMEM- *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

DMSO- *Dimethyl sulfoxide*

DNA- ácido desoxirribonucléico

DTIC- dacarbazina

eEF1A- Fator de alongamento da tradução 1 alfa

EF1Bbeta- Fator de alongamento da tradução 1 alfa

EGFR- *Epidermal growth factor receptor*

EMT- Transição epitelial mesenquimal

ErbB2- Receptor tirosina quinase 2

ERK- *extracellular signal–regulated kinases*

GAPDH- *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*

GEF- fator trocador de nucleotídeo guanina

GTPases- enzima que hidroliza guanisina trifosfato

HRF- *Histamine Releasing Factor*

HeLa- Célula epitelial de adenocarcinoma

Hs852T- linhagem celular de melanoma de pele

HRAS- regulador da divisão celular

KRAS- proteína relacionada a proliferação, maturação e diferenciação celular

LNCaP- células de câncer de próstata humano

MAPK- *Mitogen Activated Protein Kinases*

Mcl-1- *Myeloid cell leukemia 1*

MCF7- linhagem celular de câncer de mama humana dependente de hormônio

MDA-MB231- célula epitelial de câncer de mama subtipo triplo negativo

MDM2- *Mouse double minute 2 homolog*

MDM4- *Mouse double minute 2 homolog*

MeWo- linhagem celular derivada de melanoma metastático humano

Mef- *mouse embryonic fibroblast*

MEK- Mitogen-activated protein *kinase*

MTT- (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)

mTOR- *mechanistic target of rapamycin*

Nanog- transcription factor

NIH3T3- linhagem celular de fibroblasto murinho

NRAS- neuroblastoma RAS viral oncogene homolog

OCT4- *octamer-binding transcription factor 4*

PBS- *Phosphate buffered saline*

PLC-  $\gamma$ - Fosfolipase C- gama

PLK- *Pólo- quinase*

PTEN/ MMAC1- *phosphatase, tensin homologue/mutated in multiple advanced cancers*

PTD- *protein transduction domains*

P53- Proteína P53

RAS- oncogene

RAF- proto- oncogene

RBL-2H3- célula de leucemia basofílica de rato

Rheb- GTPase

RGP- Fase de Crescimento Radial

RPMI 1640- *Roswell Park Memorial Institute medium*

SDS- PAGE- *Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*

SFB- Soro fetal bovino

SIAH1- *Siah E3 ubiquitin protein ligase 1*

SK-MEL-28- linhagem celular de melanoma

TCTP- *Translationally Controlled Tumor Protein*

TEMED- *Tetramethylethylenediamine*

TSAP6- *Tumor Suppressor-Activated Pathway 6*

tpt1- gene que codifica a proteína TCTP

T47D- linhagem celular de câncer de mama humana

U937- linhagem celular de macrófagos humanos

VGP- Fase de Crescimento Vertical

WM-266-4- linhagem celular de melanoma metastático humano

WM-115- linhagem celular de tumor primário de melanoma

## LISTAS DE FIGURAS

|   |     |
|---|-----|
| Figura 1: <b>TCTP é uma proteína multifuncional</b> .....   | 28  |
| Figura 2: <b>Representação esquemática das proteínas que interagem com TCTP</b> .....                                       | 29  |
| FIGURA 3: <b>Drogas interferem com o eixo TCTP-MDM2-P53</b> .....   | 38  |
| Figura 4: <b>Isolamento de células revertentes a partir de leucemias humanas e tumores sólidos</b> .....                    | 39  |
| Figura 5: <b>Alterações moleculares propostas associadas à iniciação e progressão do melanoma</b> .....                     | 42  |
| Figura 6: <b>Frequência de alterações genéticas encontradas no melanoma</b>   | 43  |
| Figura 7: <b>Mecanismos de desregulação da via p53 em relação ao ciclo celular</b> .....                                    | 44  |
| Figura 8: <b>Via de sinalização Ras-RAf</b> .....   | 45  |
| Figura 9: <b>Avaliação do Efeito Prolongado da Sertralina sobre as Células de Melanoma Humano MeWo</b> .....                | 64  |
| Figura 10: <b>Avaliação do Efeito Prolongado da Sertralina sobre as Células de Melanoma Humano A2058</b> .....              | 66  |
| Figura 11: <b>Avaliação do Efeito Prolongado da Sertralina sobre as Células de Melanoma Humano B16F10</b> .....             | 68  |
| Figura 12: <b>Efeito do crescimento tumoral in vivo após pré- tratamento com sertralina</b> .....                           | 69  |
| Figura 13: <b>Estrutura do Cristal da Proteína TCTP</b> .....   | 86  |
| Figura 14: <b>Expressão e Purificação da LiRecTCTP</b> .....  | 102 |
| Figura 15: <b>Dicroísmo Circular da LiRecTCTP</b> .....   | 103 |
| Figura 16: <b>Efeito da LiRecTCTP sob a viabilidade das células RBL-2H3</b>   | 103 |
| Figura 17: <b>Efeito da LiRecTCTP sobre morfologia das células RBL-2H3: Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)</b> ..... | 105 |
| Figura 18: <b>Efeito da LiRecTCTP sob a liberação de <math>\beta</math>-hexosaminidase em RBL-2H3</b> .....                 | 107 |
| Figura 19: <b>Efeito da LiRecTCTP sobre o Influxo de cálcio em RBL-2H3</b>  | 108 |
| Figura 20: <b>Porcentagem da expressão relativa de interleucinas em RBL-2H3 após tratamento com LiRecTCTP</b> .....         | 109 |



|   |     |
|---|-----|
| Figura 21: Efeito da LiRecTCTP na permeabilidade vascular <i>in vivo</i> através do extravasamento do corante Azul de Evans na presença de inibidores de receptores de histamina..... | 111 |
| Figura 22: Avaliação do efeito edematogênico da LiRecTCTP na ausência e presença de anti-histamínicos.....  | 113 |
| Figura 23: Avaliação do efeito edematogênico da LiRecTCTP após a administração de anti-histamínicos.....  | 115 |
| Figura 24: Efeitos da LiRecTCTP <i>in vivo</i> : alterações macroscópicas em pele de coelho expostas as toxinas do veneno de <i>L. intermedia</i> .....                               | 116 |
| Figura 25: Efeitos da LiRecTCTP <i>in vivo</i> : alterações microscópicas em pele de coelho expostas as toxinas do veneno de <i>L. intermedia</i> .....                               | 117 |
| FIGURA 26: Afeito sinérgico da LiRecTCTP e LiRecDT1 na permeabilidade vascular <i>in vivo</i> através do extravasamento do corante Azul de Evans..                                    | 118 |

## SUMÁRIO

|  |    |
|--|----|
| 1. CAPÍTULO-1 TCTP e a Reversão Tumoral .....                          | 25 |
| 1.1 INTRODUÇÃO .....   | 25 |
| 1.2 OBJETIVOS .....  | 27 |
| 1.2.1 OBJETIVO GERAL .....   | 27 |
| 1.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....                                      | 27 |
| 1.3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....  | 28 |
| 1.3.1 TCTP .....   | 28 |
| 1.3.2 TCTP e Tumores .....   | 31 |
| 1.3.3 Reversão Tumoral .....   | 34 |
| 1.3.4 Eixo TCTP-P53 .....  | 35 |
| 1.3.5 TCTP- Alvo de Drogas .....                                       | 36 |
| 1.3.6 TCTP e Melanoma .....  | 38 |
| 1.3.7 Melanoma .....   | 40 |
| 1.3.8 Melanoma e p53 .....   | 43 |
| 1.3.9 Mutações em Melanoma (BRAF e NRAS) .....                         | 44 |
| 1.4 MATERIAL E MÉTODOS .....   | 47 |
| 1.4.1 Cultivo Celular .....  | 47 |
| 1.4.2 Efeito da Sertralina a Longo Prazo .....                         | 47 |
| 1.4.3 Proliferação Celular .....                                       | 48 |
| 1.4.4 Clonogenicidade por Soft Ágar .....                              | 48 |
| 1.4.5 Preparo dos Extratos Proteicos .....                             | 49 |
| 1.4.6 Imunoensaio .....  | 49 |
| 1.4.7 Crescimento tumoral <i>in vivo</i> .....                         | 50 |
| 1.4.8 Análise Estatística .....  | 50 |
| 1.5 RESULTADOS .....   | 51 |
| 1.5.1 Artigo: TCTP as a therapeutic target in melanoma treatment ..... | 52 |
| 1.5.2 Resultados não publicados .....                                  | 63 |

|        |   |    |
|--------|---|----|
| 1.6    | DISCUSSÃO .....   | 71 |
| 2.     | CAPÍTULO-2 LiTCTP como um Fator de Liberação de Histamina ..... | 79 |
| 2.1    | INTRODUÇÃO .....  | 79 |
| 2.2    | OBJETIVOS .....   | 82 |
| 2.2.1  | OBJETIVO GERAL .....  | 82 |
| 2.2.2  | OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....                                     | 82 |
| 2.3    | REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....                                      | 84 |
| 2.3.1  | Fator de Liberação de Histamina.....                            | 84 |
| 2.3.2  | TCTP de <i>Loxosceles intermedia</i> .....                      | 88 |
| 2.3.3  | Loxoscelismo .....  | 89 |
| 2.4    | MATERIAL E MÉTODOS.....   | 91 |
| 2.4.1  | Reagentes .....   | 91 |
| 2.4.2  | Extração do veneno por Eletrochoque.....                        | 91 |
| 2.4.3  | Expressão da Proteína Recombinante LiRecTCTP .....              | 92 |
| 2.4.4  | Purificação da Proteína LiRecTCTP .....                         | 92 |
| 2.4.5  | Dosagem de Proteínas pelo Método de Bradford .....              | 93 |
| 2.4.6  | Eletroforese de Proteína em Gel de Poliacrilamida .....         | 93 |
| 2.4.7  | Dicroísmo Circular .....  | 94 |
| 2.4.8  | Cultivo Celular .....   | 94 |
| 2.4.9  | Ensaio de Viabilidade Celular .....                             | 94 |
| 2.4.10 | Microscopia Eletrônica de Varredura.....                        | 95 |
| 2.4.11 | Dosagem de $\beta$ -hexosamina.....                             | 95 |
| 2.4.12 | Ensaio de Influxo de Cálcio .....                               | 96 |
| 2.4.13 | Extração RNA.....   | 96 |
| 2.4.14 | qPCR.....   | 97 |
| 2.4.15 | Tratamento Farmacológico <i>in vivo</i> .....                   | 98 |
| 2.4.16 | Permeabilidade Vascular .....                                   | 98 |
| 2.4.17 | Edema de Pata .....   | 99 |

|        |                              |     |
|--------|------------------------------|-----|
| 2.4.18 | Dermonecrose em coelhos..... | 99  |
| 2.4.19 | Análise Histológica .....    | 100 |
| 2.4.20 | Análise Estatística .....    | 100 |
| 2.5    | RESULTADOS.....              | 101 |
| 3.6    | DISCUSSÃO .....              | 120 |
| 4.     | CONCLUSÃO .....              | 128 |
|        | REFERENCIAS.....             | 129 |
|        | Anexos .....                 | 146 |

## 1. CAPÍTULO-1 TCTP e a Reversão Tumoral

### 1.1 INTRODUÇÃO

A proteína TCTP, do inglês *Translationally Controlled Tumor Protein*, foi identificada há aproximadamente 30 anos e recebeu diferentes denominações que enfatizam algumas de suas atividades como fortilina, relacionada com sua atividade antiapoptótica, e HRF (do inglês *Histamine Releasing Factor*), que enfatiza a atividade extracelular liberadora de histamina da proteína. A TCTP apresenta diversas propriedades biológicas e ainda sim seu papel molecular ainda não é completamente entendido (Gachet *et al.*, 1999; Bommer e Thiele, 2004; Telerman e Amson, 2009; Koziol e Gurdon, 2012). Ela possui um alto grau de conservação em todo o reino animal, sendo aproximadamente 50% de todos seus aminoácidos conservados (Thayanithy, 2005; Hinojosa-Moya *et al.*, 2008). Recentemente, o que impressiona é a variedade de atividades celulares e extracelulares descritas para a TCTP e o número de parceiros moleculares, caracterizando-a como uma proteína multifuncional (Amson *et al.*, 2012; Koziol e Gurdon, 2012; Amson, Karp, *et al.*, 2013; Amson, Pece, *et al.*, 2013; Acunzo *et al.*, 2014). Alguns autores destacam a possibilidade de que a TCTP possa estar presente em duas frações celulares, uma relacionada com a proliferação celular e outra relacionada com a comunicação celular e a liberação de histamina. O fato de que animais que possuem um único gene codificando a TCTP podem ou não secretar a proteína deixa claro que a diferente expressão tecidual e a regulação da sua localização são fatores determinantes da função (Thiele *et al.*, 2000; Amzallag *et al.*, 2004; Hinojosa-Moya *et al.*, 2008; Amson, Karp, *et al.*, 2013; Acunzo *et al.*, 2014).

Níveis aumentados da TCTP foram demonstrados em diferentes células tumorais e tumores humanos (Slaby *et al.*, 2009; Telerman e Amson, 2009; Ma *et al.*, 2010; Amson, Karp, *et al.*, 2013; Acunzo *et al.*, 2014). Além disso, a regulação negativa (*downregulation*) da TCTP tem sido utilizada com sucesso em modelos biológicos de reversão tumoral (Tuynder *et al.*, 2002; Tuynder *et al.*, 2004; Amson *et al.*, 2012; Amson, Karp, *et al.*, 2013). A redução dos níveis da TCTP está relacionada com a reprogramação de células tumorais em

células denominadas “revertentes”, as quais não apresentam mais o fenótipo maligno. A TCTP mostrou-se um regulador chave da estabilidade e atividade da P53, e estas duas proteínas apresentam repressão recíproca (Amson *et al.*, 2012). Drogas que atuam sobre a TCTP, diminuindo seus níveis, estão em triagem clínica (Telerman e Amson, 2009; Amson *et al.*, 2012; Amson, Pece, *et al.*, 2013). Efeito antitumoral pela diminuição dos níveis intracelulares da TCTP já foi observado em células de melanoma (Tuynder *et al.*, 2004). Dessa forma, a TCTP se mostra como um possível biomarcador tumoral com aplicação em testes diagnósticos (Van De Sande *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2008; Slaby *et al.*, 2009) e possível alvo terapêutico (Chung *et al.*, 2000; Zhu *et al.*, 2008; Chan, Chen, Liu, *et al.*, 2012; Amson, Karp, *et al.*, 2013).

Em modelos tumorais, estudos com drogas que inibem a atividade da TCTP mostraram diminuição do crescimento tumoral *in vitro* e *in vivo* (Tuynder *et al.*, 2004; Amson, Karp, *et al.*, 2013). Inicialmente, Tuynder e colaboradores (2004) testaram a utilização de anti-histamínicos em células tumorais e verificaram que essas drogas eram capazes de reduzir a expressão da TCTP. Por similaridade estrutural foram testadas outras drogas como sertralina, paroxetina e tioridazina, as quais também reduziram os níveis da TCTP com efeitos antitumorais *in vitro* e *in vivo* (Tuynder *et al.*, 2004). Dessa forma é de interesse avaliar o papel da TCTP na malignidade do melanoma humano e murino, sua função no processo de reversão tumoral como possibilidade terapêutica.

## 1.2 OBJETIVOS

### 1.2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a participação da proteína TCTP no fenótipo tumoral e os efeitos do tratamento com sertralina em modelo de melanoma murino e humano.

### 1.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar a expressão da TCTP e P53 das linhagens de melanoma humano e murino após tratamento com sertralina;
- Investigar o efeito da sertralina sobre a clonogenicidade, migração e viabilidade das linhagens de melanoma utilizadas;
- Avaliar os efeitos *in vivo* da sertralina e/ou dacarbazina em modelo murino (formação tumores subcutâneos B16F10 em camundongos C57BL6);
- Verificar a presença da TCTP, P53, Ki67 e caspase 9 nos tumores removidos dos camundongos tratados ou não com sertralina e/ou dacarbazina;
- Avaliar a expressão da TCTP após o tratamento de sertralina a longo prazo;
- Investigar a proliferação celular e a clonogenicidade das linhagens de melanoma após o tratamento com sertralina a longo prazo;
- Avaliar os efeitos *in vivo* após o tratamento com sertralina em modelo murino a longo prazo (formação tumores subcutâneos B16F10 em camundongos C57BL6).

## 1.3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1.3.1 TCTP

A proteína TCTP (*Translationally Controlled Tumor Protein*) foi identificada por três grupos de pesquisa diferentes que estudavam proteínas reguladas a nível traducional, recebendo três denominações distintas (P21, Q23 e P23). A TCTP também é denominada fortilina (atividade antiapoptótica) e HRF (atividade histaminérgica). Nas últimas três décadas, diversos grupos passaram a mostrar interesse no estudo das funções biológicas desta proteína, uma vez que ela mostrou participar de importantes processos celulares (Figura 1) e apresentar diversos parceiros moleculares (Figura 2) (Koziol e Gurdon, 2012; Amson, Karp, *et al.*, 2013).

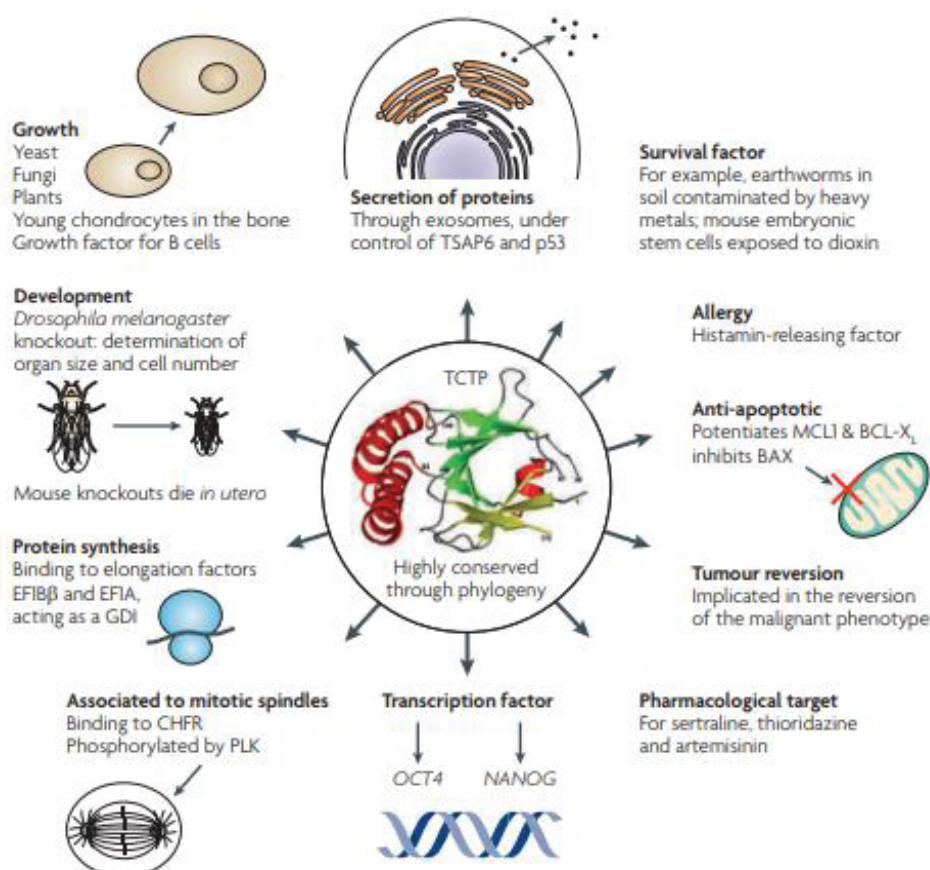


Figura 1: **TCTP é uma proteína multifuncional.** Adaptado de TELERMAN; AMSON, 2009.



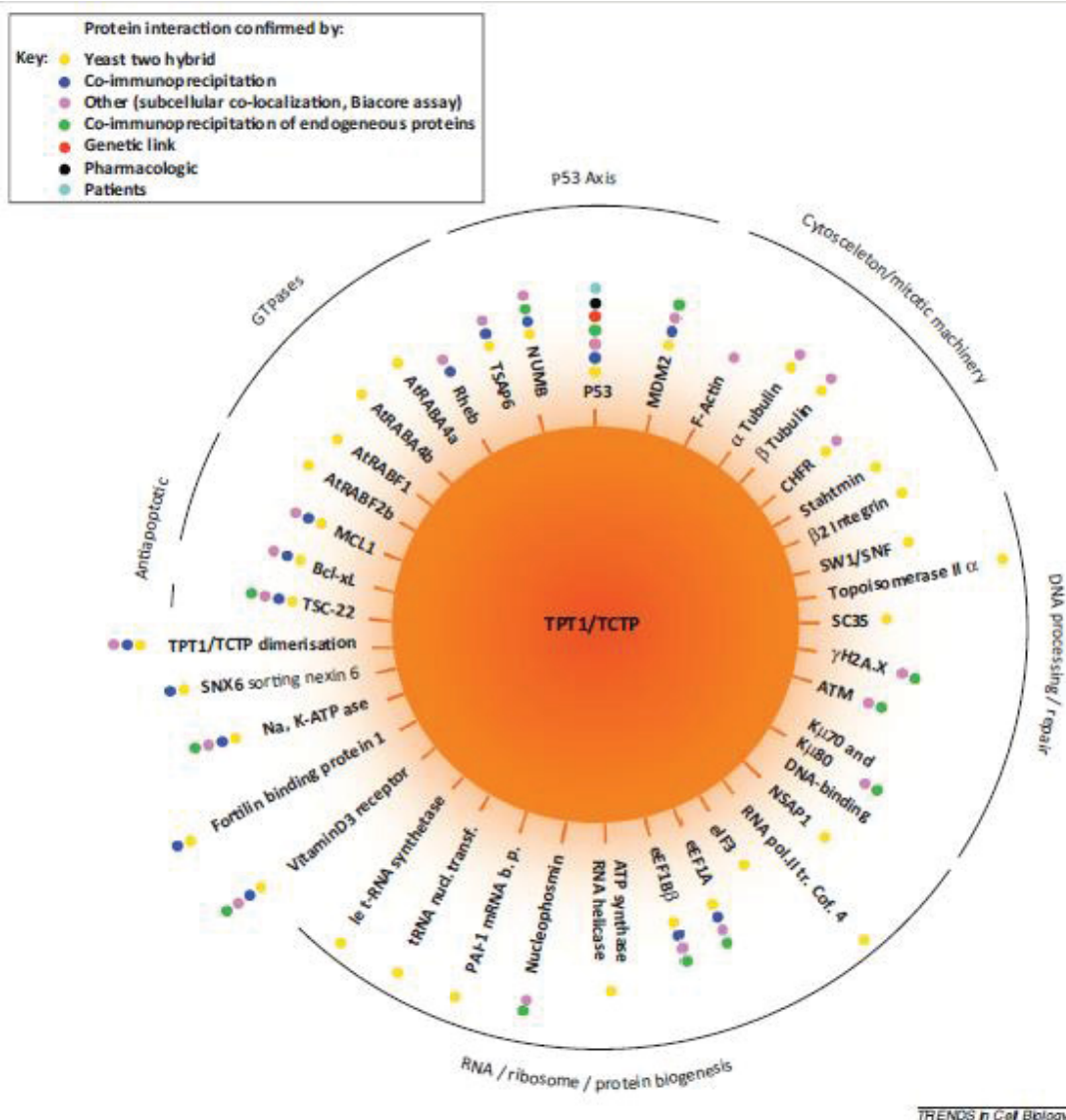


Figura 2: **Representação esquemática das proteínas que interagem com a TCTP.** Adaptado de AMSON, 2013.

Estudos anteriores revelaram que a TCTP está presente nos ambientes intracelular e extracelular e que isso está intimamente relacionado à sua participação em diversos processos biológicos como desenvolvimento, crescimento celular, divisão celular, síntese proteica, resposta imune, reversão tumoral, transformação celular, indução da pluripotência em células tronco e apoptose. Essa proteína está presente em vários tecidos, mas é expressa preferencialmente em tecidos com atividade mitótica. A expressão da TCTP é altamente regulada em nível transcricional e traducional por uma gama de sinais extracelulares (Bommer e Thiele, 2004; Tuynder *et al.*, 2004; Telerman e Amson, 2009; Amson *et al.*, 2012; Koziol e Gurdon, 2012; Nagano-Ito e

Ichikawa, 2012; Amson, Karp, *et al.*, 2013; Amson, Pece, *et al.*, 2013; Acunzo *et al.*, 2014).

A proteína TCTP é essencial para o desenvolvimento embrionário e proliferação celular em camundongos e em *Drosophila*. Além disso, ela possui a capacidade de ligar cálcio e estabilizar microtúbulos, podendo então estar relacionada ao controle do ciclo celular (Bommer e Thiele, 2004; Hinojosa-Moya *et al.*, 2008; Koziol e Gurdon, 2012; Acunzo *et al.*, 2014). Estudos têm identificado proteínas que interagem com a TCTP e mostrado que estão relacionadas a diversas vias bioquímicas e de sinalização (Figura 2). Por exemplo, foram identificadas interações entre a TCTP e a tubulina (Gachet *et al.*, 1999; Rinnerthaler *et al.*, 2006), actina-F (Bazile *et al.*, 2009), o PLK em mamíferos (Yarm, 2002), fatores de tradução e alongamento eEF1A e eEF1Bbeta (Cans *et al.*, 2003), proteína Mcl-1 (Li *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2005), proteína TSAP6 (Amzallag *et al.*, 2004), Na-K-ATPase (Jung *et al.*, 2004), proteína Bcl-XL (Yang *et al.*, 2005) e proteína Chrf (Burgess *et al.*, 2008). Recentemente, revisões da literatura sumarizaram as proteínas com as quais a TCTP interage, são dezenas de proteínas envolvidas com citoesqueleto e maquinaria mitótica, processamento e reparo de DNA, biossíntese de proteínas, via da P53, entre outros processos celulares vitais (Amson *et al.*, 2012; Koziol e Gurdon, 2012; Acunzo *et al.*, 2014). Além disso, estudos posteriores relataram o envolvimento da TCTP no processo de migração, invasão e metástase celular (Bae *et al.*, 2015).

Os níveis aumentados da TCTP em tumores quando comparado aos tecidos normais indicam um papel desta proteína na tumorigênese. A TCTP é considerada candidata a marcador tumoral e/ou alvo terapêutico em diversos tumores, como próstata, mama, fígado, rins, pulmões, colorretal, ósseo, leucemia e glioma (Tuynder *et al.*, 2002; Niforou *et al.*, 2008; Zhu *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2009; Slaby *et al.*, 2009; Telerman e Amson, 2009; Amson *et al.*, 2012; Chan, Chen e Guan, 2012; Koziol e Gurdon, 2012; Amson, Karp, *et al.*, 2013; Acunzo *et al.*, 2014; Ambrosio *et al.*, 2015; Jin *et al.*, 2015; Rocca *et al.*, 2015). Contudo, mais surpreendente que sua multifuncionalidade e seus múltiplos parceiros, é o envolvimento da TCTP no processo de reversão tumoral, o qual tem atraído atenção da comunidade científica nos últimos anos (Powers e Pollack, 2016).

### 1.3.2 TCTP e Tumores

A proteína TCTP, apesar de ter sido nomeada uma proteína ‘tumoral’, devido ao material de origem do estudo que a descreveu e caracterizou (Tuynder *et al.*, 2004), também é encontrada em células normais. A TCTP é expressa em quase todos os tipos de câncer (células e tecidos), mas em diferentes níveis (Thiele *et al.*, 2000). Na última década cresceram as evidências de que a TCTP está possivelmente relacionada ao câncer. Contudo a TCTP não se comporta como um oncogene clássico; sua superexpressão em camundongos transgênicos não induziu ou favoreceu a formação de tumores (KIM *et al.*, 2008; YUEH *et al.*, 2010). Estudos relataram que os níveis da TCTP estão relacionados ao crescimento, propriedade antiapoptóticas e tumorigênese (Koziol e Gurdon, 2012; Nagano-Ito e Ichikawa, 2012; Acunzo *et al.*, 2014). Além disso, foi sugerida a utilização da TCTP como um marcador de câncer de mama (Amson *et al.*, 2012) e carcinoma hepatocelular (Chan, Chen, Liu, *et al.*, 2012). Trabalhos utilizando amostras de câncer de cólon indicam que há um aumento da TCTP em adenomas e adenocarcinomas de cólon, comparado com o tecido normal em ensaios de imunohistoquímica (Kim *et al.*, 2008). Além disso, Bommer e colaboradores (2017) relacionaram altos níveis da TCTP com estágios iniciais de câncer colorretal, estes níveis são mantidos na progressão da doença. Em células de câncer de cólon, a expressão desta proteína é regulada positivamente durante o tratamento com quimioterápicos (5-FU e oxiplatina). A TCTP pode então estar relacionada à resistência a medicamentos contra o câncer (Bommer *et al.*, 2017).

Uma das vias pela qual a TCTP poderia promover o câncer está relacionada à sua atividade antiapoptótica. Análoga a Bcl-2, Mcl-1 e Bcl-X, a superexpressão da TCTP evita a morte celular por apoptose. Além disso, estudos demonstraram que a diminuição da expressão da TCTP em células LNCaP (células de câncer de próstata humano) está relacionada a redução da viabilidade celular (Gnanasekar *et al.*, 2009). Estudos mostraram a ligação de TCTP com Mcl-1, bem como sua ação na inibição da dimerização de Bax (Susini *et al.*, 2008) e na ativação de Bcl-xL, por meio de um domínio do tipo BH3 – ação antagônica a de outras proteínas de estrutura semelhante (Thebault *et al.*, 2016).

Lucibello e colaboradores (2011) demonstraram que células de tumor de mama do tipo triplo negativo (o subtipo mais agressivo e de mais difícil tratamento), MDA-MB231, com aumento nos níveis da TCTP, são menos sensíveis ao estresse oxidativo. Além disso, seus resultados mostram que a *downregulation* da TCTP torna as células mais sensíveis ao estresse oxidativo (Lucibello *et al.*, 2011). Outros estudos demonstraram que a superexpressão da TCTP em células de carcinoma de ovário resulta em uma maior degradação de TSC-22 (regulador positivo de p53) e o *knockdown* da TCTP aumenta a apoptose. Assim, a interação entre a TCTP e o TSC-22 previne apoptose via desestabilização de TSC-22 em células de carcinoma de ovário (Lee *et al.*, 2008). Jung e colaboradores (2014) demonstraram que a superexpressão de TCTP protege as células HeLa da morte celular induzida por drogas citotóxicas como taxol e etoposide. A TCTP é capaz de antagonizar a apoptose via mitocondrial após o tratamento com etoposide, ela pode gerar danos da membrana mitocondrial, liberação do citocromo c, ativação das caspases 9 e 3 e a clivagem por EGFR e PLC-  $\gamma$ . Além disso, ela interage com Apaf inibindo a amplificação da cascata de caspases e assim a morte celular (Jung *et al.*, 2014).

Outra importante maneira pela qual o desequilíbrio da TCTP favorece o câncer é por sua interação com a P53. Amson e colaboradores (2012) demonstraram que altos níveis teciduais da TCTP em 508 biópsias de pacientes com câncer de mama estão associados a tumores agressivos e com prognóstico ruim. O *knockdown* da TCTP em células primárias de tumor mamário provenientes de camundongos transgênicos ErbB2 (expressam o oncogene ErbB2 ativado no epitélio mamário) leva a um aumento da P53 e diminuição do número de células tronco tumorais (Amson *et al.*, 2012; Bommer, 2012).

Ma e colaboradores (2010) descobriram que em células de adenocarcinoma de cólon a superexpressão da TCTP induz a expressão de componentes do sistema ubiquitina proteossoma, biossíntese de proteínas do citoesqueleto e metástase (MA *et al.*, 2010). Além disso, outros estudos propõem um mecanismo distinto de tumorigênese dependente da TCTP. Esse mecanismo é baseado no estudo de CHD1L, que dirige a transcrição do gene

tpst1 que codifica a TCTP e atua como oncogene em aproximadamente 50% dos carcinomas hepatocelulares humanos. A superexpressão da TCTP está relacionada com o estado avançado do tumor. Essa proteína induz a saída rápida da mitose e a segregação cromossômica alterada, resultando em instabilidade cromossômica (Chan, Chen, Liu, *et al.*, 2012). Estudo posterior relacionou níveis aumentados da TCTP com câncer de próstata. Nesse trabalho foi verificada ausência ou baixa expressão da TCTP em células de próstata normais, porém em células tumorais de próstata foi possível observar níveis aumentados e constantes da TCTP (Baylot *et al.*, 2012).

Além disso, a superexpressão ou mutações que aumentem a atividade da TCTP podem levar a ativação da via de sinalização mTOR, gerando um aumento da proliferação celular que irá resultar no desenvolvimento tumoral. Da mesma forma, alterações nos níveis da TCTP podem inibir a apoptose. Qualquer alteração na TCTP pode impedir que células com danos no DNA sejam eliminadas via apoptose e desta forma promove a sobrevivência de células que podem se transformar em células cancerosas (Koziol e Gurdon, 2012). Experimentos de transferência nuclear demonstraram que a TCTP induz a transcrição de genes envolvidos com o estado pluripotente como Oct4 e Nanog. Desta forma, um aumento da TCTP em células normais pode promover a formação de fenótipos pluripotentes de expressão gênica. Isso pode reprogramar parcialmente células diferenciadas e quiescentes em células proliferativas. Além disso, mutações acumulativas nessas células podem elevar os níveis da TCTP promovendo a proliferação dessas células mutantes. Quanto maior os níveis de genes relacionados a pluripotência maior será o potencial maligno dessas células (Koziol e Gurdon, 2012).

Outra importante proteína superexpressa em tumores e relacionada ao ciclo celular é a enzima pólo quinase 1 (PLK1). A PLK1 é responsável por fosforilar a TCTP para progressão do ciclo celular durante a mitose. Dessa forma uma superexpressão de PLK1 pode gerar fosforilação da TCTP e uma rápida progressão do ciclo celular. Isso pode gerar a progressão do ciclo mesmo com a mitose incompleta, gerando uma grande quantidade de mutações que podem resultar em tumores (Koziol e Gurdon, 2012).

Estudos recentes relacionaram a TCTP com a transição celular epitelial para mesenquimal (EMT). Essa transição está relacionada com aquisição de características de células mesenquimais e com a fase inicial do processo de metastização, como alteração na adesão celular, capacidade migratória aumentada, invasividade, resistência a apoptose, aumento da produção de componentes da matriz extracelular e invasividade derivada da via extracelular de degradação da matriz extracelular. Nesse mesmo trabalho foi demonstrado que o silenciamento da TCTP inibe a EMT e reduz metástases pulmonares em células de melanoma murino *in vivo* (Bae et al., 2015).

### 1.3.3 Reversão Tumoral

Os estudos com o modelo de reversão de tumores desenvolvido pelo grupo do Dr. Adam Telerman demonstraram a importância da TCTP neste processo. Este modelo está baseado num raro evento espontâneo e fisiológico no qual as células tumorais perdem seu fenótipo maligno, passando a um fenótipo mais próximo do normal. Os genes envolvidos nesse processo foram identificados, dentre os quais o gene da TCTP (*tpt1*) mostrou ser o mais diferencialmente expresso entre as células tumorais e as revertentes derivadas. Além disso, a inibição da expressão da TCTP por técnicas de RNA de interferência resultou na supressão do fenótipo maligno (Telerman e Amson, 2009). O silenciamento do gene da proteína TCTP por siRNA em células de câncer de próstata reduz o crescimento celular e induz à apoptose (Gnanasekar *et al.*, 2009). Isto demonstra que uma diminuição dos níveis da TCTP está relacionada a um fenótipo celular mais próximo do normal.

Os modelos celulares de reversão tumoral foram obtidos utilizando linhagens tumorais e as submetendo a infecções com vírus oncolítico (que matam preferencialmente células tumorais). Desta forma foram selecionadas células revertentes espontâneas de tumores sólidos e também de tumores sanguíneos. A análise da expressão entre as linhagens parentais e as suas revertentes identificou cerca de 300 genes diferencialmente expressos na reversão tumoral. Vários deles relacionados à regulação de P53. Os principais genes diferencialmente expressos foram: SIAH1 (uma E3-ligase e alvo



transcricional de P53); Presenilina 1 (gene de predisposição à Alzheimer); TSAP6 (controla a secreção de proteínas por exossomos e alvo transcricional da P53) e a TCTP (inibidor da atividade da P53) (Telerman e Amson, 2009). Os estudos realizados por Tuynder e colaboradores (2004) indicam que a diminuição dos níveis da TCTP em linhagens de melanoma humano (WM-266-4, WM-115, SK-MEL-28 e Hs852T) revertem o fenótipo maligno, e a inibição da expressão da TCTP leva a um fenótipo de reversão tumoral em células NIH3T3 (fibroblastos) portanto a redução dos níveis da TCTP apresenta um efeito antitumoral e relaciona-se fortemente à reprogramação celular com supressão do fenótipo maligno. Outros estudos demonstraram que a TCTP, CDC2 (quinase dependente de ciclina) e PCNA (proteína auxiliar da DNA polimerase) são sub-regulados no processo de reversão tumoral (Ge *et al.*, 2011; Bommer, 2012).

#### 1.3.4 Eixo TCTP-P53

O antagonismo entre TCTP e P53 (uma das mais importantes proteínas apoptóticas) foi proposto como um dos mecanismos pelos quais a TCTP previne a morte celular por apoptose. Estudos mostraram que o aumento da expressão da TCTP em carcinoma de pulmão reverteu a apoptose mediada por P53, enquanto o *knockdown* aumentou a apoptose (Rho *et al.*, 2011). Dessa forma alguns autores demonstraram que a TCTP está relacionada com P53, inibindo a apoptose mediada por P53 (Chen *et al.*, 2011). Diferentes estudos sugeriram diferentes sítios de ligação para P53 e diferentes mecanismos de antagonismo. Rho e colaboradores (2011) sugeriram que a P53 liga-se ao domínio interno da TCTP, no domínio  $\alpha$ -hélice e que o antagonismo acontece, pois a TCTP atua desestabilizando P53. Já Chen e colaboradores (2011) relataram que a P53 se liga as partes C- e N-terminal da proteína TCTP (folha- $\beta$ ) e que o antagonismo ocorre devido à TCTP bloquear a ativação transcricional induzida de Bax (proteína pró-apoptótica) por P53.

Estudos recentes sugeriram um *feedback* negativo entre a TCTP e a P53 no qual a TCTP promove a ubiquitinação e degradação da P53, mediada por MDM2. Já a P53 regula negativamente a TCTP por inibir a transcrição e

promover a secreção da TCTP (Amson *et al.*, 2012). A proteína P53 regula negativamente a expressão da TCTP por se ligar ao elemento responsivo a P53 na região promotora da TCTP inibindo sua transcrição. Além disso, a P53 promove a secreção da TCTP via exossomos, pois a ativação da P53 leva à expressão da TSAP6 (proteína necessária para secreção via exossomos) e, conseqüentemente, sua ligação à TCTP e secreção por exossomos. Já a TCTP regula a expressão da P53 através da sua degradação. A TCTP interage com MDM2 (ubiquitinase), impedindo sua auto-ubiquitinação, propiciando a ubiquitinação da P53 e sua degradação via proteossomas (Amson *et al.*, 2012) (Figura 3).

### 1.3.5 TCTP- Alvo de Drogas

Buscando drogas que pudessem diminuir os níveis da TCTP, Tuynder e colaboradores (2004) testaram a ação de diversos anti-histamínicos (bronfeniramina, prometazina, hidroxizina e dexclorfeniramina) pois a TCTP possuir uma atividade como fator de liberação de histamina. Houve redução nos níveis da TCTP quando as células foram tratadas com hidroxizina e prometazina, além dessas drogas apresentarem efeitos citopáticos sobre as células. Outros fármacos, com similaridade estrutural com essas drogas, também apresentavam efeito citotóxico em baixas concentrações, como a tioridazina, sertralina, perfenazina, clorpromazina, paroxetina e o flupentixol. Dentre essas drogas, a sertralina e a tioridazina apresentaram efeitos marcantes: redução dos níveis da TCTP, bem como diminuição da viabilidade celular *in vitro* e diminuição do volume tumoral *in vivo* (Tuynder *et al.*, 2004).

A sertralina e a tioridazina atuam diminuindo os níveis da TCTP por se ligarem diretamente a essa proteína, impedindo sua interação com MDM2 e, assim promovem a ubiquitinação e degradação da MDM2. Desta forma, essas drogas restauram os níveis da P53 (Amson *et al.*, 2012). Estudos recentes demonstraram que a Nutlina-3 (um derivado do imidazol) antagoniza a associação entre P53 e MDM2 inibindo a ligação da TCTP à MDM2, elevando assim os níveis da P53. Em ensaios utilizando células-tronco de câncer de



mama foi possível observar que tanto a sertralina quanto a nutlina-3 foram capazes de aumentar a expressão da P53. Como a P53 é uma proteína repressora transcricional da TCTP, a sertralina foi capaz de diminuir os níveis da TCTP. Além disso, a ativação da P53 leva a ativação da TSAP6 que desencadeia a secreção da TCTP por via exossomal, culminando para redução dos níveis proteicos da TCTP. Dessa forma, essas drogas interferem no antagonismo recíproco entre TCTP e P53 por dois estágios. Primeiro, por aumento dos níveis da P53, pela inibição da interação da TCTP e MDM2. Segundo, repressão transcricional da TCTP e secreção da TCTP via exossomos, promovida pelo aumento da P53 (Figura 3). Ainda existe outra via independente da P53 relacionada à atividade antiproliferativa da sertralina, atuando sob a via de sinalização da mTOR. O mecanismo que poderia relacionar a TCTP a essa via é o fato dessa proteína poder atuar como um fator trocador de nucleotídeo guanina (GEF) para Rheb, porém ainda são necessários mais estudos para entender melhor essa função da TCTP (Tuynder *et al.*, 2004; Hsu *et al.*, 2007; Amson *et al.*, 2012; Funston *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2012; Amson, Pece, *et al.*, 2013; Acunzo *et al.*, 2014).

A proteína TCTP também foi identificada como um possível alvo da droga Artemisina (fármaco antimalárico e tóxico para células tumorais), capaz de alquilar e inativar a proteína TCTP presente no citoplasma de *Plasmodium falciparum* (Bhisutthibhan e Meshnick, 2001; Efferth, 2007; Telerman e Amson, 2009). Tuynder e colaboradores (2004) testaram o uso de drogas para suprimir os níveis da TCTP em células U973 (linfoblasto isolado de pulmão), o que resultou na indução de citotoxicidade nessas células. Todas as observações sugerem que a TCTP pode ser um biomarcador para testar a eficiência de drogas para o tratamento do câncer (Tuynder *et al.*, 2004; Acunzo *et al.*, 2014).

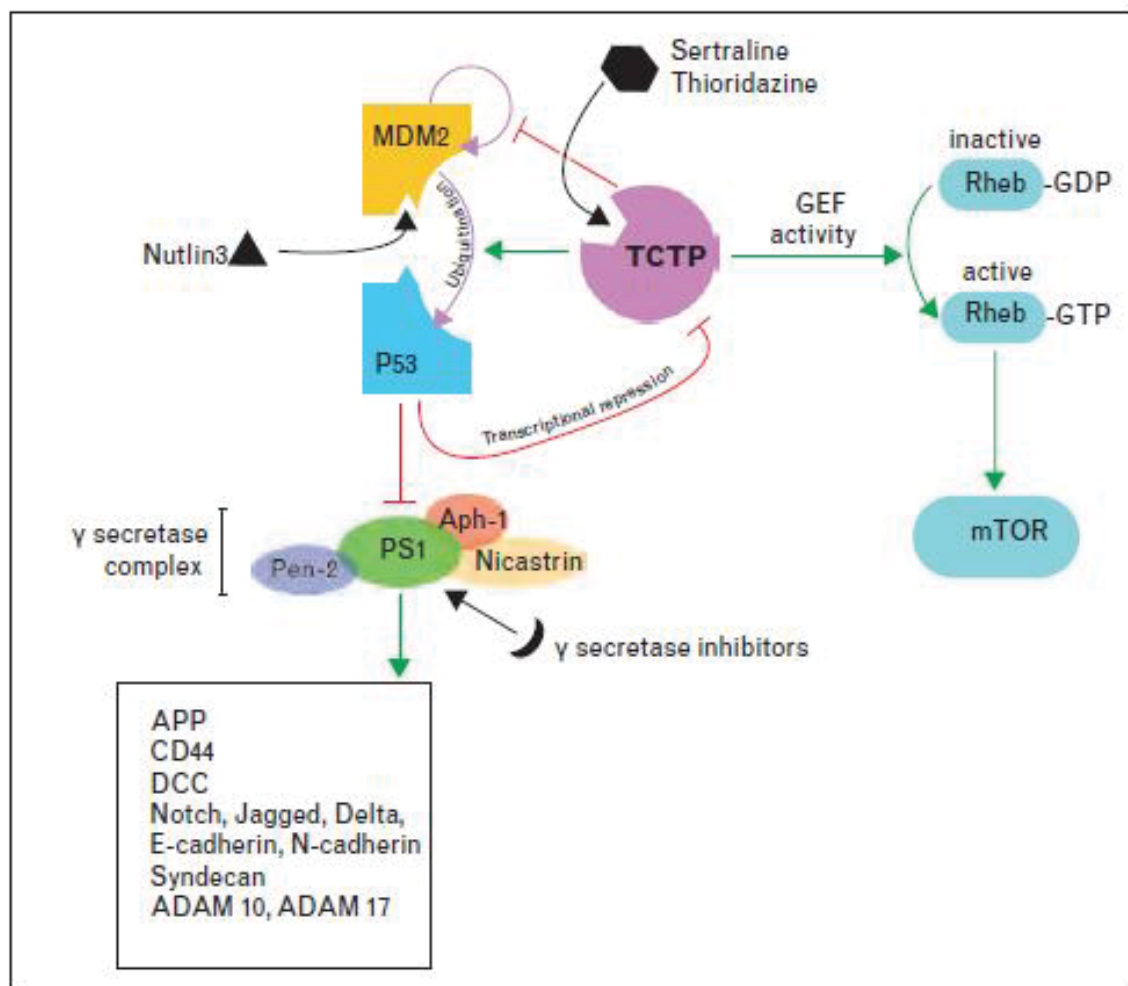


Figura 3: **Drogas interferem com o eixo TCTP-MDM2-P53.** Adaptado de AMSON et al., 2013.

### 1.3.6 TCTP e Melanoma

Tuynder e colaboradores (2004) desenvolveram os primeiros modelos de reversão tumoral utilizando diferentes linhagens celulares. A infecção com H1 parvovírus foi utilizada para seleção dos clones revertentes. Após 3 ciclos de infecção, os clones viáveis foram isolados e estudados (Figura 4). Neste estudo se utilizou as linhagens de melanoma WM-266-4, WM-115, SK-MEL-28 e Hs852T. Observou-se uma alta suscetibilidade dos melanomas à infecção viral e a diminuição dos níveis da proteína TCTP nos modelos de melanoma revertentes foi evidenciada. Quando estudado o potencial de clonogenicidade em meio semi-sólido (*soft ágar*) e a tumorigenicidade *in vivo* das células revertentes foi possível observar uma redução de 82% no número de colônias

em meio semi-sólido e de 75% nos tumores formados em camundongos. Esses dados demonstram que a TCTP é uma proteína importante no modelo de reversão tumoral em melanoma e apontam estratégias que envolvam diminuição dos níveis da TCTP como promissoras para o tratamento do melanoma (Tuynder *et al.*, 2004).

Além disso, um estudo proteômico comparando o proteoma da linhagem de melanoma humano MeWo e suas contrapartidas quimioresistentes à vindesina, cisplatina, fotemustina e etoposide, mostrou a TCTP como uma proteína preferencialmente expressa nas linhagens resistentes (Sinha *et al.*, 2000).

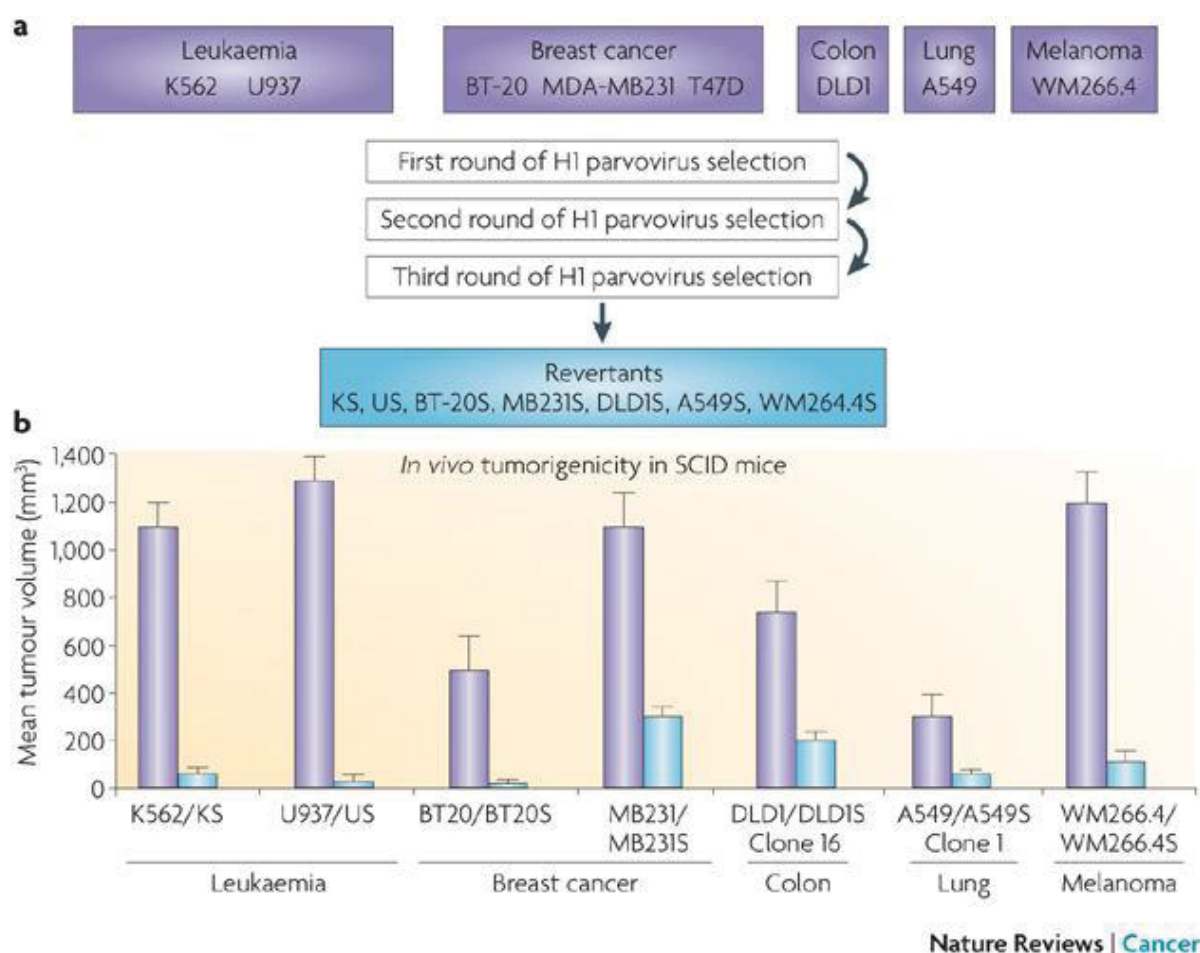


Figura 4: **Isolamento de células revertentes a partir de leucemias humanas e tumores sólidos.** Adaptado de TELERMAN, 2009.

### 1.3.7 Melanoma

O melanoma é um tipo de câncer cutâneo derivado de melanócitos (células produtoras de melanina) transformados. O desenvolvimento do melanoma tem sido associado à suscetibilidade genética e fatores ambientais predisponentes, como a alta exposição aos raios ultravioletas (principalmente UVB) (Tucker e Goldstein, 2003; Morton *et al.*, 2009). Estima-se que a incidência do câncer de pele não melanoma seja mais de 75% dos casos de câncer no Brasil; esse é prevalente em indivíduos adultos de cor branca e com predominância nas regiões sul e sudeste do país (INCA, 2018). O melanoma metastático, o mais perigoso tipo de câncer de pele, é responsável por 75% das mortes por câncer de pele em todo mundo (Isola *et al.*, 2016). Essa neoplasia maligna possui péssimo prognóstico em estados avançados além de ser reconhecida como um dos cânceres mais agressivos, por apresentar alta propensão às metástases e ser refratária ao tratamento com quimioterápicos (Saleem *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2013). A crescente incidência do melanoma, seu alto grau de malignidade e a ausência de uma terapia eficaz têm motivado a comunidade científica a buscar modelos adequados para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.

Não existem muitas possibilidades de tratamento eficaz para curar pacientes com melanoma metastático, e o tempo médio de sobrevida desses pacientes é de cerca de 6 meses. Atualmente, a dacarbazina, um agente alquilante, é utilizada no tratamento do melanoma metastático, além de ser considerada a droga de escolha no tratamento do melanoma quando comparado com outras drogas estudadas. A atividade anti-tumoral da dacarbazina resulta da metilação de ácidos nucleicos ou diretamente de dano no DNA levando à parada do crescimento celular ou morte celular. Entretanto, a taxa de remissão completa da dacarbazina é menor que 5%. Além disso, como um agente único, não tem nenhum efeito evidente sobre a sobrevida do paciente. Não existem dados na literatura que demonstrem que a combinação da dacarbazina com qualquer outra molécula produza uma melhora significativa na resposta clínica ou sobrevida global do paciente comparada com a monoterapia (Li *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2012; Pretto e Neri, 2013; Zhang *et al.*, 2013). Atualmente, tem se avançado no estudo de estratégias imunológicas

para o tratamento do melanoma contudo são terapias de alto custo e de disponibilidade restrita (Aris *et al.*, 2017).

Acredita-se que vários fatores contribuam para o surgimento do melanoma como: predisposição genética, traumatismos repetitivos em nevos preexistentes, alterações hormonais, viroses, deficiência imunológica e particularmente exposição à luz solar. Aparentemente a exposição à radiação ultravioleta de forma intensa e intermitente, sem tempo para produção de melanina para proteção das células, leva a lesões no DNA e mutações, envolvendo principalmente o gene supressor de tumor PTEN/MMAC1, sendo que a perda da heterozigose foi detectada em mais de 40% dos melanomas (Adam e Efron, 1983; Saida, 2001; Perlis e Herlyn, 2004; Oliveria *et al.*, 2006).

A hierarquia das células-tronco tumorais foi sugerida para o melanoma: células primitivas auto-renováveis capazes de iniciar a tumorigênese originam células altamente proliferativas e mais indiferenciadas que constituem o centro da massa tumoral (Zabierowski e Herlyn, 2008; Kumar *et al.*, 2017). Experimentalmente, células *stem-like* foram propagadas, provenientes tanto de células de melanoma em cultivo quanto de isolados clínicos de tumores de pacientes. Estas células, esféricas, não aderentes e capazes de auto-renovação e diferenciação em várias linhagens mesenquimais, também iniciavam tumores em modelos de xenotransplante com um número bastante pequeno de células (Fang *et al.*, 2005).

O modelo clássico de progressão do melanoma humano, assim como ocorre em alguns modelos de camundongos, ocorre a partir de um nevo benigno. Este é formado por uma população de melanócitos que proliferam de maneira organizada e forma uma lesão hiperplásica, geralmente em resposta a radiação UV, que não progride devido à senescência celular (Gray-Schopfer *et al.*, 2006; Mooi e Peeper, 2006; Vultur e Herlyn, 2013). Uma vez vencida essa barreira proliferativa, esses nevos tornam-se displásicos e podem progredir para um estado de espalhamento superficial, chamada Fase de Crescimento Radial (RGP), que é confinado a epiderme e possui baixo potencial invasivo. Posteriormente, essas células RGP podem adquirir a capacidade de invadir a derme rompendo a membrana basal, etapa chamada de Fase de Crescimento Vertical (VGP). Dados clínicos sugerem que nem todos os melanomas surgem

dessa forma, pois já foram observados casos de doença metastática sem evidente lesão primária (Miller e Mihm, 2006). Na Figura 5 podemos observar um desenho esquemático proposto para progressão do melanoma (Vultur e Herlyn, 2013).

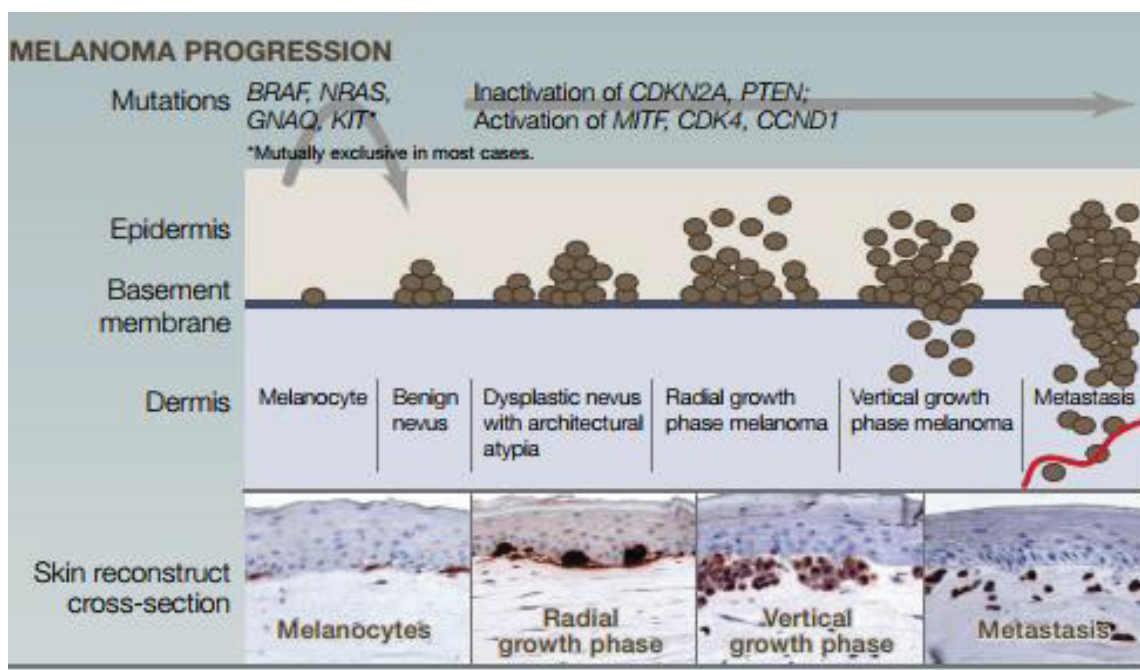


Figura 5: **Alterações moleculares propostas associadas à iniciação e progressão do melanoma.** Proliferação aberrante de melanócitos normais, possivelmente em resposta à radiação UV, resultando na formação de nevos benignos ou displásicos. Fase de crescimento radial do melanoma (RGP) apresenta capacidade de crescimento intraepidermal, seguida de invasão da derme na fase de crescimento vertical (VGP) culminando em metástase. Adaptado de VULTUR e HERLYN, 2013.

Alguns genes de suscetibilidade ao melanoma já foram descritos em pacientes afetados pela doença e validados em modelos animais. Dentre eles estão as mutações herdadas nos genes *CDKN2A* (Hocker e Tsao, 2007; Vultur e Herlyn, 2013) e *CDK4* (Sotillo *et al.*, 2001; Vultur e Herlyn, 2013), as mutações espontâneas em *BRAF* (Davies *et al.*, 2002; Hocker e Tsao, 2007; Vultur e Herlyn, 2013), *NRAS* (Hocker e Tsao, 2007; Vultur e Herlyn, 2013) e *TP53* (Hussein *et al.*, 2003; Vultur e Herlyn, 2013). O melanoma pode ser resultado da modulação epigenética da expressão gênica, sendo muitos genes desregulados por metilação do DNA, assim como por modificações em histonas (Muthusamy *et al.*, 2006; Rothhammer e Bosserhoff, 2007). Dentre as alterações genéticas mais comuns no melanoma, temos algumas mutações



como as encontradas em BRAF e NRAS, e algumas amplificações (TERT e CCND1) ou deleções (CDKN2A e PTEN) (Vultur e Herlyn, 2013) (Figura 6).

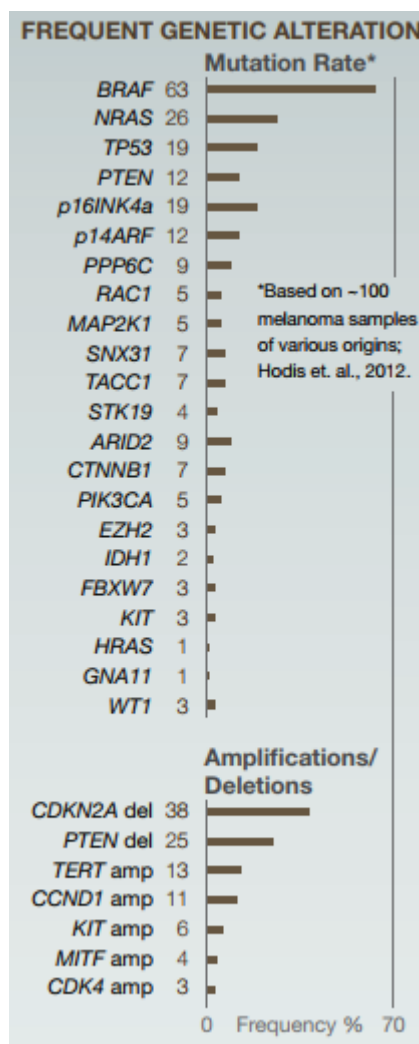


Figura 6: **Frequência de alterações genéticas encontradas no melanoma.** Adaptado de VULTUR e HERLYN, 2013.

### 1.3.8 Melanoma e p53

A proteína P53 é um importante fator de transcrição que induz eventos como a parada do ciclo celular, apoptose e senescência, além de limitar a proliferação celular anormal. Em melanoma, apesar de existir uma ligação clara entre p53 e o melanoma induzido por radiação UV e a interação entre p53 com as mutações BRAF, NRAS e HRAS promovendo a melanogênese, a mutação em p53 não é frequente. Além disso, alterações em proteínas que modulam negativamente a atividade de p53 como MDM2 e MDM4, podem superar a supressão tumoral mediada por p53 em melanoma. Sabe-se que a

superexpressão de MDM2, aumento de MDM4 e mutações no supressor de tumor p14ARF, que ativa a p53 pela inibição de MDM2, leva para a inativação de p53 na maioria dos melanomas cutâneos. Estes resultados destacam o potencial valor terapêutico na reativação de p53 não mutado em combinação com outros tratamentos para melanoma (Jochemsen, 2014; Lee *et al.*, 2015) .

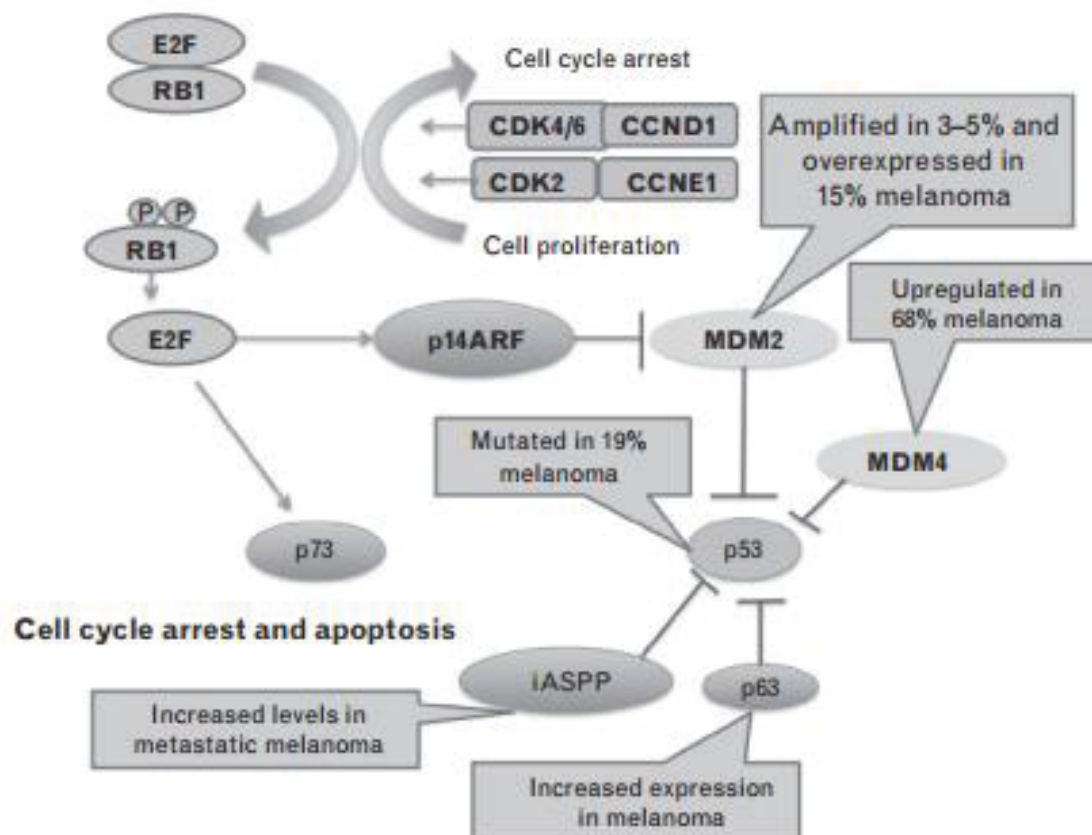


Figura 7: **Mecanismos de desregulação da via p53 em relação ao ciclo celular.** Adaptado de LEE et al., 2015.

### 1.3.9 Mutações em Melanoma (BRAF e NRAS)

Algumas mutações importantes em melanoma estão relacionadas a proteína quinase ativadora de mitose (MAPK) essas mutações tipicamente aparecem posteriormente às mutações em BRAF e NRAS. A presença de mutações em BRAF em pacientes com melanoma primário está relacionada ao tempo de recidiva e de sobrevida após a doença. Além disso, pacientes com essas mutações apresentam pior prognóstico (Glitz e Davies, 2014).



Muitas alterações moleculares em melanoma envolvem a sinalização intracelular pela via MAPK, assim como quinases extracelulares pela via ERK. Em condições fisiológicas normais essas moléculas são mediadores chave do crescimento celular por três isoformas de RAS GTPases (HRAS, KRAS e NRAS). Quando algum ligante entra em contato com receptores na membrana celular ocorre estimulação de RAF (ARAF, BRAF E CRAF) (Figura 7). Essas proteínas levam a fosforilação e ativação da quinase MEK, a qual, subsequentemente, ativa ERK. A complexidade dessa via aumenta com a grande variabilidade de componentes. Três subtipos de Ras (HRAS, NRAS e KRAS), três subtipos de RAF (ARAF, BRAF e CRAF), dois subtipos de MEK (MEK1 e MEK2) e dois subtipos de ERK (ERK1 e ERK2), são importantes nesse processo, e agem como proteínas codificadas por genes com funções próprias e diferentes mecanismos de interação (Munoz-Couselo *et al.*, 2015).

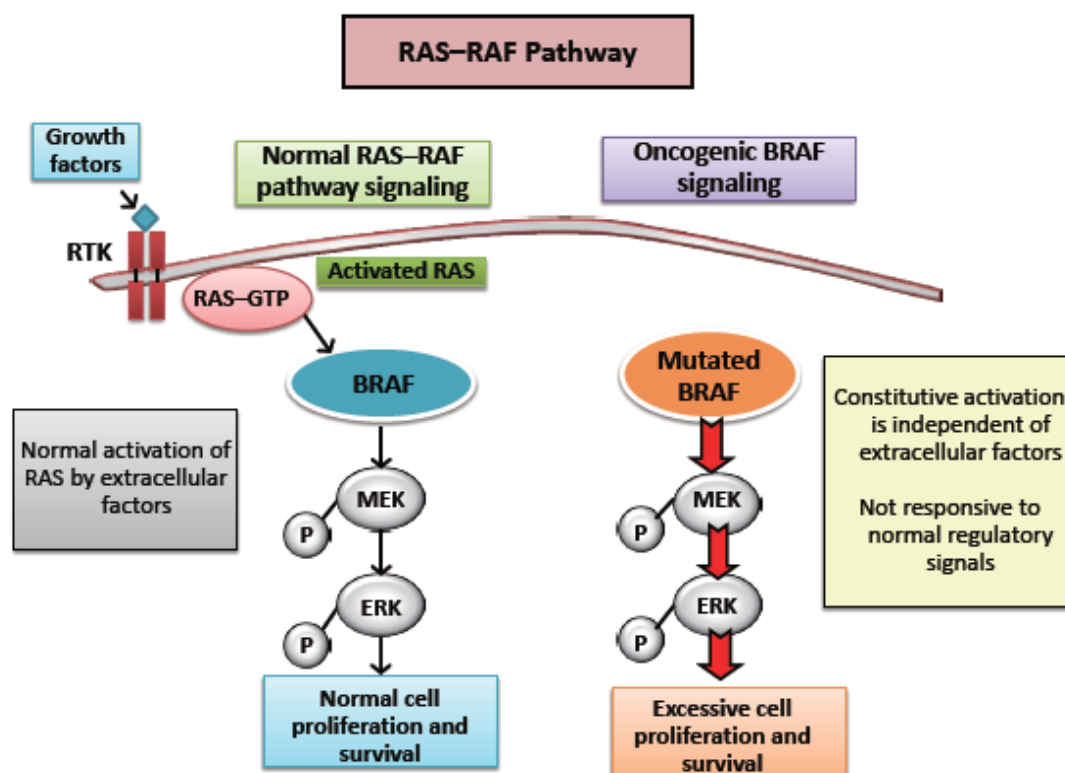


Figura 8: **Via de sinalização Ras-RAF.** Adaptado de MUÑOZ- COUSELO *et al.*, 2015.

A ativação da quinase MAP (MAPK) por mutações ontogênicas é descrita em 90% dos melanomas. A via RAS-RAF-MEK-ERK é ativada constitutivamente em tumores humanos através de RAS ou RAF. Além disso, mutações em BRAF são encontradas em 8% dos tumores, sendo desses, 50% em melanomas. Já foram encontradas mais de 50 diferentes mutações em BRAF em melanoma. Muitas dessas mutações estão localizadas no domínio quinase em BRAF ou MEK. A mais comum é a substituição de timina por uma adenina, isso gera a troca de um aminoácido valina por um ácido glutâmico (V600E). Como resultado, temos a ativação permanente de BRAF e assim da via MAPK, resultando em crescimento e proliferação celular descontrolada. Outra mutação frequente em BRAF é a V600K (16%) e V600D (3%) (Munoz-Couselo *et al.*, 2015).

NRAS é o segundo oncogene mais comumente ativado em melanomas malignos, após BRAF. Ao contrário do que acontece em mutações BRAF em nevo benigno, as mutações de NRAS são encontradas em apenas 14% das amostras de melanoma. A presença de uma mutação em NRAS em um paciente com melanoma tem valor prognóstico. Esses pacientes geralmente possuem idade superior a 55 anos, um padrão de exposição solar crônico, presença de tumores com espessura reduzida, aumento do número de mitoses, uma menor frequência de ulceração e o tempo de sobrevida desses pacientes é menor do que nos doentes com mutações em BRAF (Devitt *et al.*, 2011).

## 1.4 MATERIAL E MÉTODOS

Os materiais e métodos dos dados publicados constam no artigo Boia-Ferreira et al., 2017 anexado no item 2.5 - Resultados dessa tese. Segue, portando, a metodologia aplicada nos ensaios ainda não publicados.

### 1.4.1 Cultivo Celular

As linhagens celulares B16-F10, MeWo e A2058 foram obtidas da *American Type Tissue Culture Collection* (Manassas, USA). A linhagem B16-F10 (melanoma murino) foi mantida em *Dulbecco's Minimum Essential Medium* (DMEM, Cultilab) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB, Cultilab), enquanto as linhagens de melanoma humano (MeWo e A2058) foram mantidas em RPMI 1640 (Cultilab) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB, Cultilab). Em todos os meios foi adicionado 40 mg/L de gentamicina (Schering-Plough, Kenilworth, USA). As células foram mantidas a 37°C, em atmosfera com 5 % de CO<sub>2</sub>.

### 1.4.2 Efeito da Sertralina a Longo Prazo

Para verificar se o tratamento com sertralina poderia induzir o processo de reversão tumoral, com uma reprogramação celular e perda do fenótipo maligno de forma estável, avaliamos os efeitos da sertralina a longo prazo (após a suspensão do tratamento por 5 dias em cultivo regular). As células B16-F10, MeWo e A2058 foram plaqueadas em placas para cultivo celular em meio DMEM (B16-F10) e meio RPMI 1640 (MeWo e A2058) suplementado com 10% de SFB. As células foram tratadas com 1 µM de sertralina por 72 horas (BOIA-FERREIRA et al., 2017), tratamento suficiente para reduzir os níveis intracelulares da TCTP. O DMSO (0,1 µM) é utilizado como solvente para a sertralina. Como controles utilizamos meio contendo DMSO (v/v) em quantidade igual à presente no tratamento com sertralina e meio de cultivo com 10% SFB. Para avaliar os efeitos a longo prazo, após os três dias o tratamento

foi retirado e adicionado meio com 10% SFB (condição regular de cultivo). Após 5 dias de cultivo as células resuspensas e submetidas aos ensaios posteriores.

#### 1.4.3 Proliferação Celular

Para o ensaio de proliferação foram plaqueadas  $10^4$  células previamente tratadas (1  $\mu$ M de sertralina por 72 horas e depois 5 dias de cultivo em condições regulares) em placas de 96 poços em meio DMEM contendo 10% de SFB. Após 16 horas o meio foi trocado por DMEM sem SFB e as células incubadas por 24 horas. As células foram então plaqueadas e a proliferação celular avaliada após 24, 48 e 72 horas. As células foram então lavadas com tampão PBS e fixadas com Formaldeído 4%. Após 10 minutos foi adicionado 100  $\mu$ L de metanol 2%. Posteriormente as células foram coradas com cristal violeta 0,5% por 10 minutos. A placa foi então lavada e o corante impregnado nas células solubilizado com 100  $\mu$ L de citrato de sódio 0,1M (metanol 50%, pH 4,2). A reação foi medida em espectrofotômetro (TECAM Intinite M200) em 550 nm.

#### 1.4.4 Clonogenicidade por Soft Ágar

Para avaliar a capacidade de formação de colônias (crescimento independente de ancoragem) foram utilizadas placas de 6 poços contendo uma camada de Ágar 0,5% em DMEM contendo 10% SFB e gentamicina (40 mg/L) (1,5mL/poço). Após a solidificação desta camada, foi preparada uma solução contendo  $10^3$  células previamente tratadas (1  $\mu$ M de sertralina por 72 horas e depois 5 dias de cultivo em condições regulares) (B16-F10, A2058 e MeWo) em ágar 0,35% em DMEM contendo 10% SFB e gentamicina (40 mg/L), a qual foi adicionada aos poços (1,5 mL/poço) previamente preparados. As placas foram incubadas a 37°C a 5% CO<sub>2</sub> por 20 dias. Após este tempo, as células foram coradas com 500  $\mu$ L de Cristal Violeta 0,005% por 1 hora. As colônias foram contadas utilizando microscópio invertido LEICA DMIL.

#### 1.4.5 Preparo dos Extratos Proteicos

Extratos protéicos das linhagens celulares B16-F10, MeWo e A2058 foram obtidos de aproximadamente  $10^6$  células previamente tratadas (1  $\mu$ M de sertralina por 72 horas e depois 5 dias de cultivo em condições regulares). As células foram retiradas e ressuspensas em 100  $\mu$ L de tampão de lise (20mM Tris-HCl, pH 7,6, 50mM KCl, 400mM NaCl, 1mM EDTA, 0,2mM PMSF, 2mg/mL de aprotinina, 2mg/mL leupetina, 1mM DTT, 1% Triton X-100 e 20% de glicerol). Após ressuspensão foram sonicadas e potência média por 15 segundos a 4°C, os tubos foram então centrifugados a 20.000 xg por 30 minutos a 4°C. Os sobrenadantes foram coletados e a quantidade de proteína foi dosada pelo método Micro BCA ProteinAssay Kit (ThermoScientific, Waltham, USA).

#### 1.4.6 Imunoensaio

O ensaio de *Western Blot* foi realizado para avaliar e identificar a presença das proteínas TCTP, P53 e GAPDH (controle endógeno) nos extratos celulares. Após eletroforese em SDS-PAGE 15%, 50  $\mu$ g do extrato total de proteínas foram transferidas do gel para membranas de nitrocelulose (Whatman, Dassel, Alemanha) utilizando Trans-Blot Semi-Dry (BioRad, Hercules, CA) com aplicação de voltagem constante (10 V) por 30 minutos em tampão de transferência (48mM Tris, 39mM Glicina, 20% metanol, pH9,2). As membranas de nitrocelulose foram bloqueadas com PBS contendo caseína, por 1 hora à temperatura ambiente. Para detecção das proteínas TCTP e GAPDH (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) nos extratos, fitas contendo 50  $\mu$ g de proteínas do extrato foram incubadas com anticorpo policlonal específico por 16 horas à temperatura de 4°C. Em seguida, as membranas foram lavadas e incubadas com anticorpo secundário (1:5000), conjugado à peroxidase, durante 1 hora a temperatura ambiente. Para revelação foi utilizado um substrato quimioluminescente West Dura (Pierce Co.) (Wright, 1989).

#### 1.4.7 Crescimento tumoral *in vivo*

Células B16-F10 ( $5 \times 10^5$  células/ animal) previamente tratadas (1  $\mu$ M de sertralina por 72 horas e depois 5 dias de cultivo em condições regulares) foram injetadas via subcutânea em camundongos C57BL/6. Após 17 dias os animais foram anestesiados e eutanasiados. Os tumores foram removidos, fotografados e pesados.

#### 1.4.8 Análise Estatística

Os resultados foram submetidos a análise estatística, sendo as repetições e o tratamento avaliados. Os resultados dos ensaios *in vitro* foram submetidos à análise de variância (ANOVA - duplo sem repetição); e para avaliar as diferenças entre os tratamentos e controle foi utilizado o teste de Bonferroni que permite estabelecer a diferença mínima significativa entre duas médias. Os dados *in vivo* foram submetidos a análise teste t pareado. A significância foi definida como \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  ou \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

## 1.5 RESULTADOS

O primeiro capítulo desse trabalho de tese descreve os resultados relativos ao estudo da proteína TCTP no contexto do melanoma humano e murino. Parte destes dados compuseram um artigo científico que foi publicado em 22 de agosto de 2017 no British Journal of Cancer, 117, p656-665 (Boia-Ferreira et al., 2017) (doi:10.1038/bjc.2017.230) (Fator de Impacto 6.127, Qualis A1 da CAPES/CBII), e há resultados ainda não publicados. O manuscrito foi composto pelos dados obtidos durante meu doutorado (Figuras 1, 2, 5 e 6: referentes a ensaios *in vitro* utilizando sertralina e ensaios *in vivo* utilizando sertralina e dacarbazina). Além disso, contém dados obtidos durante o mestrado (Figuras 3 e 4: referentes ao estudo comparativo entre as linhagens B16-F1 e B16-F10 e ao silenciamento da TCTP nestas linhagens de melanoma murino).

Outros artigos publicados, produzidos durante o doutorado e resultado de colaborações científicas estão anexados (Anexos).

Item 1: (DE SALGADO et al., 2018) Tribromophenol Affects the Metabolism, Proliferation, Migration and Multidrug Resistance transporters Activity of Murine Melanoma Cells B16F1. Artigo de co-autoria proveniente de colaboração, publicado no Toxicology In Vitro (F.I. 2,866).

Item 2: (DORIA et al, 2018) Time Does Matter! Acute Copper Exposure Abolishes Rhythmicity Of Clock Gene In *Danio rerio*. Artigo de co-autoria proveniente de colaboração, publicado no Ecotoxicology And Environmental Safety (F.I. 3,743)

Item 3: (TANHOFFER et al. 2016) Blood Profile and General Health Status in Sedentary and Physically Active Individuals with Spinal Cord Injury Artigo de co-autoria proveniente de colaboração, publicado no Journal Of Exercise Physiology Online (F.I. 0,41).

Item 4: (BEDNASKI et al., 2015), Characterization of Brown Spider (*Loxosceles Intermedia*) Hemolymph: Cellular and Biochemical Analyses. Artigo de co-autoria proveniente de colaboração, publicado na Toxicon (F.I.=1,927).

Item 5: (BUCH et al., 2015), Brown Spider (*Loxosceles* Genus) Venom Toxins: Evaluation of Biological Conservation by Immune Cross-Reactivity. Artigo de co-autoria proveniente de colaboração, publicado na Toxicon (F.I.=1,927)

Os artigos foram incluídos nesta primeira versão de tese na sua forma original, com intuito de facilitar a apreciação dos membros da banca examinadora.

#### 1.5.1 Artigo: TCTP as a therapeutic target in melanoma treatment

M Boia-Ferreira<sup>1</sup>, A B Basilio<sup>1</sup>, A E Hamasaki<sup>1</sup>, F H Matsubara<sup>1</sup>, M H Appel<sup>2</sup>, C R V Da Costa<sup>1</sup>, R Amson<sup>3</sup>, A Telerman<sup>3</sup>, O M Chaim<sup>1</sup>, S S Veiga<sup>1</sup> and A Senff-Ribeiro\*<sup>1</sup>

1- Department of Cell Biology, Centro Politécnico, Federal University of Paraná, UFPR, Jardim das Américas, CEP 81531-990, Curitiba, Paraná, Brazil;

2- Department of Structural, Molecular Biology and Genetics, State University of Ponta Grossa, Ponta Grossa, Paraná, Brazil and

3- Institute Gustave Roussy, Unité Inserm U981, Bâtiment B2M, Villejuif, France

\*Author to whom correspondence should be addressed.

Corresponding author:

Prof. Dr. Andrea Senff-Ribeiro

Address: Centro Politécnico, Department of Cell Biology, Federal University of Paraná, UFPR, Jardim das Américas, CEP 81531-990, Curitiba, PR, Brazil.

Telephone number: +55 41 3361 1750

FAX NUMBER: +55 41 3361 2042

E-MAIL: senffribeiro@gmail.com; senffribeiro@ufpr.br



Keywords: TCTP; tpt1; melanoma; HRF; sertraline; dacarbazine

# TCTP as a therapeutic target in melanoma treatment

M Boia-Ferreira<sup>1</sup>, A B Basílio<sup>1</sup>, A E Hamasaki<sup>1</sup>, F H Matsubara<sup>1</sup>, M H Appel<sup>2</sup>, C R V Da Costa<sup>1</sup>, R Amson<sup>3</sup>, A Telerman<sup>3</sup>, O M Chaim<sup>1</sup>, S S Veiga<sup>1</sup> and A Senff-Ribeiro<sup>\*1</sup>

<sup>1</sup>Department of Cell Biology, Centro Politécnico, Federal University of Paraná, UFPR, Jardim das Américas, CEP 81531-990, Curitiba, Paraná, Brazil; <sup>2</sup>Department of Structural, Molecular Biology and Genetics, State University of Ponta Grossa, Ponta Grossa, Paraná, Brazil and <sup>3</sup>Institute Gustave Roussy, Unité Inserm U981, Bâtiment B2M, Villejuif, France

**Background:** Translationally controlled tumour protein (TCTP) is an antiapoptotic protein highly conserved through phylogeny. Translationally controlled tumour protein overexpression was detected in several tumour types. Silencing TCTP was shown to induce tumour reversion. There is a reciprocal repression between TCTP and P53. Sertraline interacts with TCTP and decreases its cellular levels.

**Methods:** We evaluate the role of TCTP in melanoma using sertraline and siRNA. Cell viability, migration, and clonogenicity were assessed in human and murine melanoma cells *in vitro*. Sertraline was evaluated in a murine melanoma model and was compared with dacarbazine, a major chemotherapeutic agent used in melanoma treatment.

**Results:** Inhibition of TCTP levels decreases melanoma cell viability, migration, clonogenicity, and *in vivo* tumour growth. Human melanoma cells treated with sertraline show diminished migration properties and capacity to form colonies. Sertraline was effective in inhibiting tumour growth in a murine melanoma model; its effect was stronger when compared with dacarbazine.

**Conclusions:** Altogether, these results indicate that sertraline could be effective against melanoma and TCTP can be a target for melanoma therapy.

Translationally controlled tumour protein (TCTP) initially named Q23, P21, and P23, according to its molecular mass, is involved in regulating fundamental cellular processes and is overexpressed in several tumour types (Chung *et al*, 2000; Amson *et al*, 2013). Since its characterisation, TCTP has been related to tumourigenesis and cancer progression (Koziol and Gurdon, 2012). Numerous studies show that TCTP level in tumour is higher than that in the corresponding normal tissues, including prostate, renal, breast, and lung cancers (Amson *et al*, 2013; Acunzo *et al*, 2014; Ambrosio *et al*, 2015; Rocca *et al*, 2015). These observations point to TCTP's critical role in tumourigenesis and highlight its putative role as a therapeutic target in several cancers. Silencing TCTP was shown to induce tumour reversion, a process overriding the malignant process at the molecular level (Tuynder *et al*, 2002, 2004; Telerman and Amson, 2009). The decrease of TCTP levels were related to

inhibition of tumour growth and the loss of tumour features (high levels cell proliferation and migration) (Amson *et al*, 2013; Acunzo *et al*, 2014). Sertraline was first investigated in the context of TCTP and tumours because of the similarity of its structure to antihistaminic compounds; because TCTP encodes for a histamine-releasing factor, the hypothesis that inhibitors of the histaminic pathway could be effective against tumour cells was evaluated. Several articles had already shown that sertraline inhibits tumour growth *in vivo* (Tuynder *et al*, 2004). There are epidemiologic studies showing a protective effect and a decreased risk of tumour development (in breast, colorectal, lung cancers) among users of high doses of selective serotonin reuptake inhibitors, including sertraline (Xu *et al*, 2006; Coogan *et al*, 2009; Toh *et al*, 2009; Wernli *et al*, 2009). There is a negative feedback loop between TCTP and P53. Translationally controlled

\*Correspondence: Professor Dr A Senff-Ribeiro; E-mail: senffribeiro@gmail.com

Revised 27 April 2017; accepted 23 June 2017

© 2017 Cancer Research UK. All rights reserved 0007–0920/17

tumour protein promotes P53 degradation, inhibits MDM2 autoubiquitination, promotes MDM2-mediated ubiquitination, and degradation of P53. Additionally, P53 directly represses TCTP transcription (Amson *et al.*, 2012). In this context sertraline binds directly to TCTP (Amson *et al.*, 2013). The effects of decreasing TCTP in melanoma were analysed using both sertraline and siRNA. *In vivo* analysis was performed using a C57BL/6 mice model and compared with the alkylating agent dacarbazine (DTIC). Although DTIC is a long-established and standard treatment for metastatic melanoma, its efficiency is low (Pretto and Neri, 2013). The results reported here provide a basis for the evaluation of TCTP targeting in melanoma and suggests sertraline as a potential drug.

## MATERIALS AND METHODS

**Cell culture and animals.** Human melanoma cell lines and murine melanoma cells (B16-F1 and B16-F10) were obtained from ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA). Murine cells were cultured in DMEM media and human cells were maintained in RPMI 1640, both supplemented with 10% (v/v<sup>-1</sup>) fetal bovine serum (FBS) (Cultilab, Campinas, Brazil) and 40 mg ml<sup>-1</sup> gentamicin, in humidified 5% CO<sub>2</sub>-95% air at 37 °C. C57BL/6 mice (female, 8–12 weeks old) were provided from the Central Animal House of the Pontifical Catholic University of Paraná, Brazil and received a standard laboratory diet (Purina). All procedures used in this study were approved by the Institutional Ethics Committee of the Federal University of Paraná (no. 730).

**Small interfering RNA.** The siRNAs of tpt1/TCTP were synthesised by Ambion (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Sense siRNA, (5'-AGCACAUCUUGCUAAUUUTT-3'); antisense siRNA, (5'-AAAUUAGCAAGGAUGUGCUTA-3'). All procedures were performed under RNase-free conditions, using RNase-free water. Approximately 10<sup>5</sup> B16-F10 cells were transfected with a final concentration of 50 nM of siRNA duplexes using Lipofectamine reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). After 24, 48, and 72 h transfection, cells were collected and used for cell viability, migration, and proliferation assays, RT-PCR analysis and western blot analysis. The siRNAs used herein were carefully evaluated concerning the main characteristics associated with highly active siRNAs: moderate-to-low (33,3%) guanine-cytosine content, lack of internal secondary structure within the siRNA (high-ΔG unfavoured secondary structures), and low stability of binding interactions at the 5' terminus of the guide siRNA strand, a uridine residue at position 10 of the sense strand, lack of immunostimulatory sequences within the siRNA, and lack of secondary structure of the target site (Reynolds *et al.*, 2004). BLASTn search to potential siRNAs and Smith-Waterman dynamic programming sequence alignment algorithm were performed: BLASTn analysis showed the confidence parameter (*E*-value) to the right annealing between the siRNA and the target sequence is 250-fold higher than the second predicted hypothetical sequence; furthermore, the TCTP is the only known protein sequence that has 100% identity.

**Quantitative real-time PCR.** Total RNA was extracted from tissues or cells using TRIzol Reagent (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. The RNA concentrations were measured with a NanoVue Plus spectrophotometer (GE Healthcare) and 10 pg total RNA was used. Real-time PCR was performed using the Power SYBR Green RNA-to-CT 1-Step Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Primers for TCTP (sense 5'-GAGCTGTTCTCCGACATCTCAAG-3'; antisense 5'-AGTCACACCATCTTCACGGTAGTC-3'), P53 (sense 5'-GTCACAGCACATGACGGAGG-3'; anti-sense 5'-TCTTCCAGATGCTCGGGATAC-3') and GAPDH (sense 5'-

AACGACCCCTTCATTGACCTC-3'; antisense 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTAG-3') were based on validated sequences from Primer Bank (Spandidos *et al.*, 2010). The relative quantification value for each target gene was compared with the endogenous control (GAPDH), which was expressed as 2<sup>-(Ct - Cc)</sup> (Ct and Cc are the mean threshold cycle differences after normalising to GAPDH).

**Protein extract and western blot.** After treatment for 24, 48, and 72 h with sertraline or siRNA, cultured cell pellets were homogenised and lysed in ice-cold lysis buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.6, 50 mM KCl, 400 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.2 mM phenylmethylsulphonyl fluoride, 2 μg ml<sup>-1</sup> aprotinin, 2 μg ml<sup>-1</sup> leupeptin, 1 mM dithiothreitol, 1% Triton X-100, and 20% glycerol). The lysates were separated by centrifugation at 20 000 g for 30 min at 4 °C; the supernatants were collected and aliquots were made. All protein concentrations were determined using the MicroBCA Assay (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). An aliquot (50 μg protein per lane for cellular extract and 100 μg protein per lane for tumour extract) of the cell per tissue lysate was separated by 15% SDS-PAGE gel, and then the proteins were transferred onto a nitrocellulose membrane. The primary antibodies against TCTP, GAPDH, and P53 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) were used according to the manufacturer's instruction. The membranes were further incubated with HRP-linked anti-rabbit IgG and HRP-linked anti-mouse IgG (1:5000). The protein-antibody complexes were detected by using the chemiluminescent substrate according to the manufacturer's instructions and the emitted light captured on X-ray film or using Amersham Imager 600 (Little Chalfont, UK). The intensity of each band was analysed using 'histogram analyses' in the ImageJ Analysis Software (Schneider *et al.*, 2012) to confirm reductions or increases (data not shown).

**Cell viability assays.** Human melanoma (MeWo and A2058) cells and murine melanoma (B16-F10) (5 × 10<sup>3</sup> cells per well) cells were plated for 16 h on 96-well plates and then grown in medium containing FBS. The medium was then replaced by a serum-free one. After 16 h, this was replaced with medium containing 10% of FBS plus sertraline at different concentrations (0.01, 0.1, and 1 μM) in pentaplicate. Controls consisted of the respective medium alone and in the presence of 550 μM DMSO, which was the sertraline solvent. After 24, 48, and 72 h, the viability of cells in each well was determined using Cell Titer-Glo luminescent assay reagent, following the manufacturer's instructions (Promega, Madison, WI, USA). Luminescence was quantified using Tecan Infinite X-100 (Männedorf, Switzerland). Experiments were performed in pentaplicate and repeated two times. Alternatively, murine melanoma B16-F1 and B16-F10 cells were plated (5 × 10<sup>4</sup> cells) in 24-well plates and transfected using tpt1/TCTP siRNA (50 nM) and negative siRNA control. After 24, 48, and 72 h, cells were stained with Trypan blue and counted in a haemocytometer. Trypan blue experiments were performed in pentaplicate and repeated three times.

**Cell migration assays.** Human melanoma cell lines' migration was measured in a two-dimensional 'scratch' assay. To repress proliferation cells were treated with mitomycin C (10 μg ml<sup>-1</sup>) for 2 h, before the cell monolayer was scratched with a pipette tip. Cells were then incubated with sertraline (0.01, 0.1, and 1 μM) for 24 h. Scratches were monitored using the Olympus CellR Live Cell Imaging System (Tokyo, Japan) with an IX81 motorised inverted microscope (Tokyo, Japan) and a Hamamatsu camera (Tokyo, Japan), fitted with a climate chamber. Images were acquired using the Olympus excellence RT software (Olympus, Hamburg, Germany). Relative migratory capacity was determined by calculating the percentage of the cell-free area. Experiments were performed in pentaplicate and repeated twice. Alternatively, migration assays were performed using uncoated cell culture



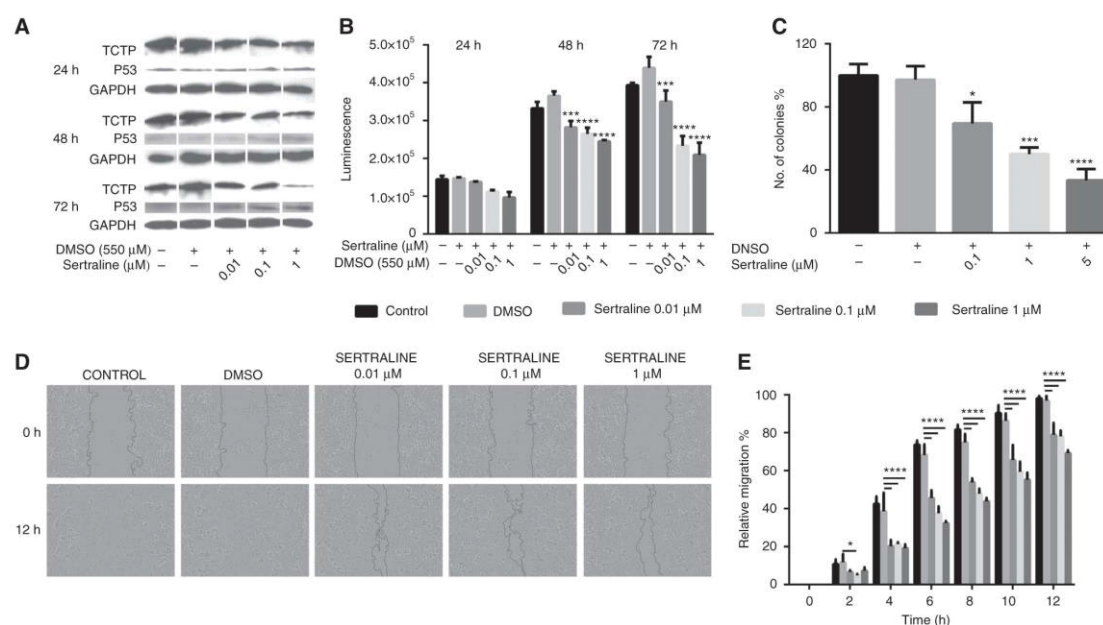
inserts with 8  $\mu\text{m}$  pores (Corning Life Sciences, Corning, NY, USA) according to the manufacturer's instructions. Briefly, B16-F10 cells were transfected with siRNA to tpt1/TCTP and with a negative control for 24, 48, and 72 h. Cells were harvested and resuspended in serum-free medium at a density of  $5 \times 10^4$  cells per well. B16-F1, B16-F10, B16-F10-tpt1 siRNA, and B16-F10 control siRNA were seeded into the upper chamber. Lower chambers were filled with medium containing 10% FBS as a chemoattractant. After 6 h, cells were fixed and permeabilised with methanol and stained with 0.5% Crystal violet/20% methanol. The non-migrating cells on the upper surface of the filter were removed by cotton swab. The number of migratory cells was measured by counting at  $\times 100$  magnifications using a microscope. Experiments were performed in triplicate and repeated three times.

**Clonogenic assay (anchorage-independent cell transformation assay).** Soft agar method was used to evaluate colony formation capacity of melanoma cells. Human and murine melanoma cells ( $5 \times 10^3$  cells per well) were treated with sertraline (0.1, 1, and  $5 \mu\text{M}$ ) in media containing 1.5 ml of 0.5% agar (DMEM or RPMI 1640) and supplemented with 10% (v/v) of FBS, and 40 mg ml<sup>-1</sup> gentamicin. Cultures dishes were maintained at 37 °C in a 5% CO<sub>2</sub> incubator for 15 days. Cell colonies were stained with 0.005% Crystal violet, and counted

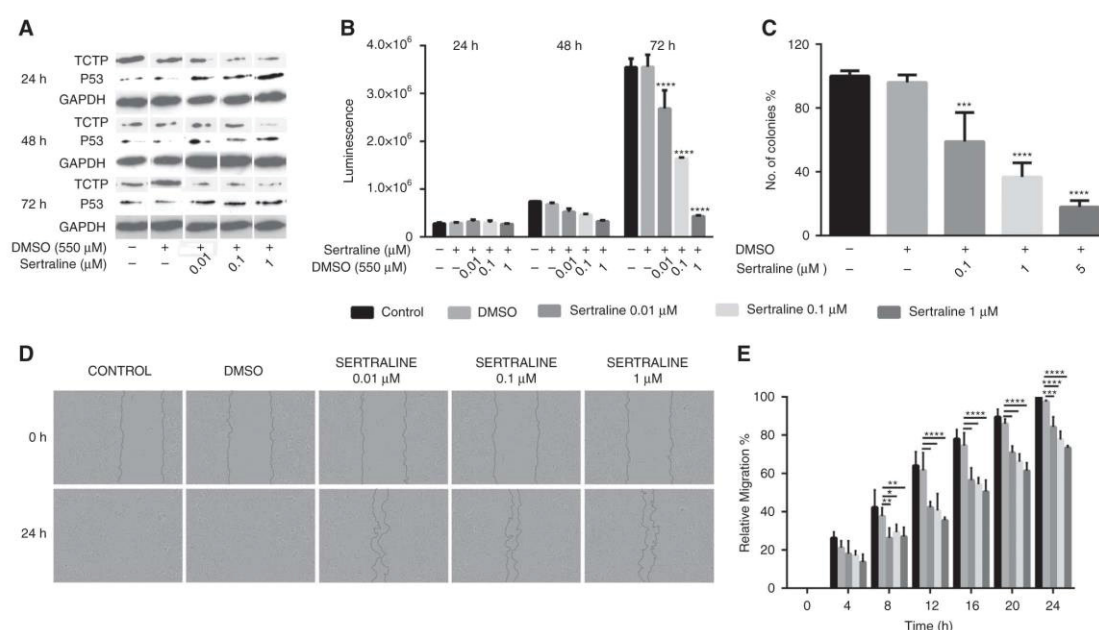
at light microscope. Experiments were performed in duplicate and repeated three times.

**Cell proliferation assays.** Murine melanoma cells ( $10^4$  cells per well) were plated for 16 h on 96-well plates in medium containing FBS. The medium was then replaced by a serum-free one. After 16 h, serum-free medium was replaced with medium containing 10% of FBS and cells were transfected with siRNA to tpt1/TCTP and with a negative control (control siRNA). After 24, 48, and 72 h, the number of cells in each well was determined using Violet crystal method (Borges *et al.*, 2013). Experiments were carried out in pentaplicate and repeated three times.

**In vivo tumour growth.** The C57BL/6 mice were subcutaneously injected with B16-F10 cells ( $5 \times 10^5$  cells per animal), and a solid tumour developed at the injection site. Intraperitoneal treatments started 5 days after injection of the cells. Mice were treated with a daily dose of sertraline (10 mg kg<sup>-1</sup>, in 100  $\mu\text{l}$ ). The control groups received 100  $\mu\text{l}$  of DTIC solution (60 mg kg<sup>-1</sup>) and the respective vehicle under the experimental conditions described for the treated groups: water for DTIC and/or aqueous solution containing DMSO (2.4 mM) for sertraline. All mice were kept under observation for 17 days (12 days of treatment) and then killed using the combination (1:1) of xilazine cloridrate/ketamine



**Figure 1.** (A) Western blot analysis of TCTP, P53, and GAPDH protein levels in MeWo cells treated with sertraline (0.01, 0.1, and 1  $\mu\text{M}$ ) and with a negative control (dimethyl sulphoxide (DMSO)) (24, 48, and 72 h). Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase was used as an endogenous control for each sample. (B) Cell viability was determined using Cell Titer-Glo assay (Promega). MeWo cells were plated in 96-well plates ( $5 \times 10^3$  cells per well) and treated with sertraline (0.01, 0.1, and 1  $\mu\text{M}$ ), negative control (DMSO) or only medium (control) in soft agar. After 24, 48, and 72 h, Cell Titer-Glo reagent was added in the medium and luminescence was measured by Tecan (Tecan Infinite M200, Männedorf, Switzerland). Data were analysed by comparing the lines treated with sertraline and the negative control (DMSO) using two-way analysis of variance (ANOVA) with Tukey's post hoc test. Two independent experiments were performed ( $n = 5$ ) (\*\*\* $P < 0.001$ , and \*\*\*\* $P < 0.0001$ ). (C) Clonogenic assay. A total of  $5 \times 10^3$  cells were incubated with sertraline (0.1, 1, and 5  $\mu\text{M}$ ), negative control (DMSO) or only medium (control) in soft agar. After 15 days, cells were stained with Crystal violet and the number of colonies was counted. Three independent experiments were performed ( $n = 2$ ) (\* $P < 0.1$ , \*\*\* $P < 0.001$  and \*\*\*\* $P < 0.0001$ ). Data represent mean  $\pm$  s.d. of three independent experiments. (D) Representative images from 'scratch' migration assay. A total of  $5 \times 10^4$  cells were plated in 96-well plates, treated with mitomycin C and then the cell monolayer was scratched and incubated in the presence of sertraline (0.01, 0.1, and 1  $\mu\text{M}$ ), DMSO or only medium (control) in soft agar. Scratches were monitored hourly for 12 h. (E) Relative migratory capacity was determined by calculating the percentage of the cell-free area using the ImageJ Analysis Software. Data represent mean  $\pm$  s.d. of three independent experiments (\* $P < 0.1$  and \*\*\*\* $P < 0.001$ ).



**Figure 2.** Effect of sertraline in A2058 human melanoma cell line. **(A)** Western blot analysis of TCTP, P53, and GAPDH proteins in A2058 cell line. Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase was used as an endogenous control for each sample. **(B)** Cell viability was determined using Cell Titer-Glo (Promega). A2058 cells were plated in 96-well plates ( $5 \times 10^3$  cells per well) and treated with sertraline (0.01, 0.1, and  $1 \mu\text{M}$ ), a negative control (dimethyl sulphoxide (DMSO)) or only medium (control) in soft agar. After 24, 48, and 72 h, Cell Titer-Glo reagent was added in the medium and luminescence was measured by Tecan (Tecan Infinite M200). Data were analysed by comparing the lines treated with sertraline and the negative control (DMSO) using two-way analysis of variance (ANOVA) with Tukey's *post hoc* test. Two independent experiments were performed ( $n=5$ ) ( $*P<0.1$  and  $****P<0.0001$ ). **(C)** Clonogenicity assay. A total of  $5 \times 10^3$  cells were incubated with sertraline (0.1, 1, and  $5 \mu\text{M}$ ), negative control (DMSO) or only medium (control) in soft agar. After 15 days, cells were stained with Crystal violet and the number of colonies was counted. Three independent experiments were performed ( $n=2$ ) ( $***P<0.001$  and  $****P<0.0001$ ). Data represent mean  $\pm$  s.d. of three independent experiments. **(D)** Representative images from 'scratch' migration assay. A total of  $5 \times 10^4$  cells were plated in 96-well plates, treated with mitomycin C and then the cell monolayer was scratched and incubated in the presence of sertraline (0.01, 0.1, and  $1 \mu\text{M}$ ), DMSO or only medium (control) in soft agar. Scratches were monitored hourly for 24 h. **(E)** Relative migratory capacity was determined by calculating the percentage of the cell-free area using Image J program. Data represent mean  $\pm$  s.d. of three independent experiments ( $*P<0.1$ ,  $**P<0.01$ ,  $***P<0.001$ , and  $****P<0.001$ ).

cloridrate (10%) in  $50 \mu\text{l}$ . Tumours were excised, photographed and their weights were determined. Tumour tissues were collected for total protein extraction and histochemical analysis. Experiments were performed using groups of five animals per condition and repeated two times. All procedures involving animals were performed in accordance with Brazilian Federal Laws, and with the Ethical Subcommittee on Research Animal Care Agreement number 730 of the Federal University of Paraná. The protocols applied in carrying out the investigations require a high standard of ethics and are in agreement with the Ethical Principles established by Experimental Animal Brazilian Council (COBEA), and with the requirement of the 'Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)'.

**Immunohistochemical studies.** Immunohistochemical analyses of TCTP expression were performed on Tissue-Tek OCT compound-fixed tumour sections obtained from B16-F10 tumours from the *in vivo* experiments. Tumour glass slides were blocked with PBS containing 1% BSA and 0.025% Triton X-100 for 20 min. Samples were incubated with primary antibodies against TCTP (Santa Cruz Biotechnology), Ki67 (Spring Bioscience, Pleasanton, CA, USA), caspase-3 (Biocare Medical, Pacheco, CA, USA), and P53 (Santa Cruz Biotechnology) in 1% BSA/PBS overnight at  $4^\circ\text{C}$ , and then washed and incubated with fluorescent secondary antibody (Invitrogen) for 1 h at room temperature. Samples were

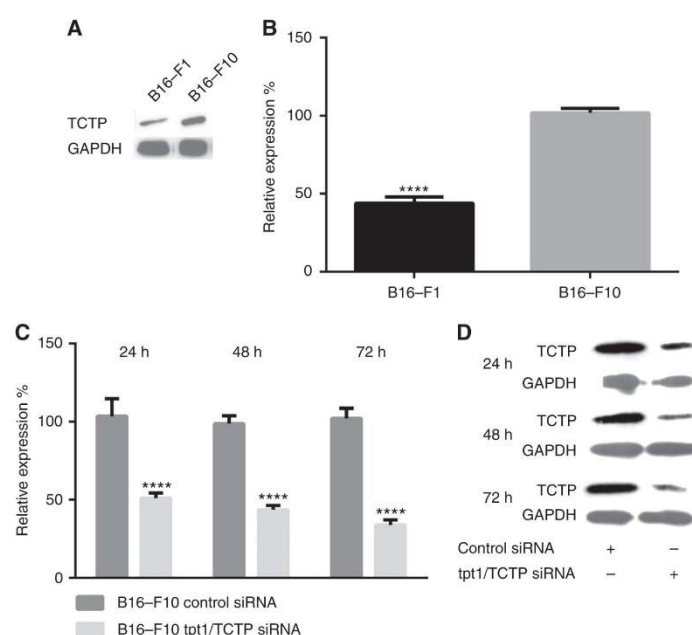
washed, dried and mounted in medium containing DAPI (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), and imaged on Nikon A1RSiMP (Nikon, Tokyo, Japan).

**Statistical analysis.** Statistical analyses were performed using ANOVA with Tukey's *post hoc* test for average comparisons using the GraphPad Prism 6 program. Statistical significance was established at  $P<0.1$ .

## RESULTS

**Effects of sertraline on human melanoma cell lines.** Sertraline treatment was analysed in the context of the human melanoma cell lines MeWo and A2058, and were further assessed for protein expression levels and biological effects. Figure 1A shows TCTP and P53 levels after incubation with sertraline. A decrease in TCTP protein level and an increase in P53 were observed. Sertraline decreased the viability of MeWo melanoma cells in a time- and concentration-dependent manner (Figure 1B). In the soft agar assay, the number of colonies formed in the presence of sertraline was reduced by  $\sim 50\%$  ( $1 \mu\text{M}$ ) and by  $65\%$  ( $5 \mu\text{M}$ ) when compared with the control (DMSO) (Figure 1C). The effects of sertraline on the reduction of the migration phenotype were also highly significant (Figure 1D). A scratch assay was performed in the





**Figure 3.** Expression of TCTP protein in B16-F1 and B16-F10 cells. (A) Western blot analysis of TCTP and GAPDH proteins in B16-F1 and B16-F10 cell lines. Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase was used as an endogenous control for each sample. (B) Quantitative real-time PCR of TCTP mRNA levels in B16-F1 and B16-F10 melanoma cells. For quantification, we used the  $\Delta\Delta C_t$  method with GAPDH as an endogenous control for each sample (\*\*\*\* $P < 0.001$ , compared with control) in soft agar. Data represent mean  $\pm$  s.d. of three independent experiments. (C) Silencing of tpt1/TCTP by siRNA in B16-F10 cells. Percentage of relative expression of TCTP after transfection with 50 nM of siRNA for tpt1/TCTP or negative control (control siRNA). Analysis of TCTP levels using RT-PCR in B16-F10 cell line at 24, 48, and 72 h after transfection. For quantification, we used the  $\Delta\Delta C_t$  method using GAPDH as an endogenous standard for each sample. For graphics,  $\Delta\Delta C_t$  was normalised to the controls. Data were analysed by comparing the lines transfected with tpt1/TCTP siRNA and the negative control using t-test. Two independent experiments were performed ( $n = 5$ ) (\*\*\*\* $P < 0.0001$ ). (D) Western blot analysis of TCTP and GAPDH protein levels in B16-F10 cells were determined after transfection with 50 nM of tpt1/TCTP siRNA and negative control (24, 48, and 72 h). Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase was used as an endogenous control for each sample.

presence of different concentrations of sertraline and cell migration was analysed each hour for 12 h (Figure 1D graph). Even low doses (0.01 and 0.1  $\mu\text{M}$ ) could significantly inhibit the melanoma cells migration.

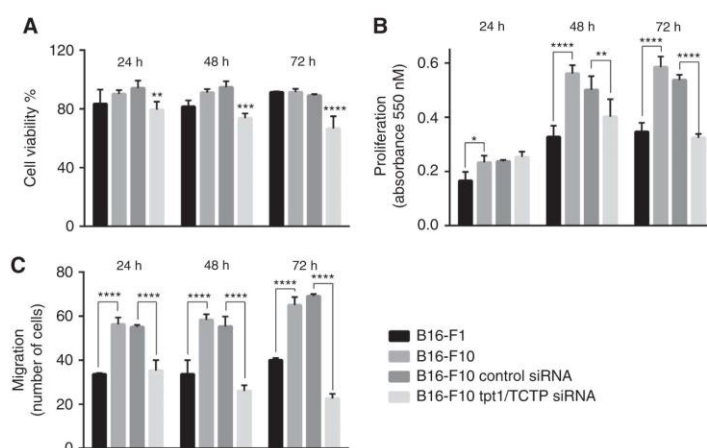
The same set of experiments was performed on the A2058 human melanoma cell line that was also very sensitive to sertraline treatment (Figure 2). Translationally controlled tumour protein levels were decreased and P53 levels were increased after sertraline treatment (Figure 2A). Cell viability was significantly decreased after sertraline treatment (Figure 2B). Sertraline also caused a marked decrease in the number of colonies formed in the soft agar (Figure 2C). The higher concentration (5  $\mu\text{M}$ ) inhibited by  $\sim 80\%$  the formation of colonies. Figure 2D shows that melanoma cell migration was also strongly affected by sertraline treatment, in all tested concentrations (0.01, 0.1, and 1  $\mu\text{M}$ ). Taken together, these results show that, in MeWo and A2058 cells, sertraline decreases TCTP and inhibits cell viability, colony formation and cell migration.

**High TCTP levels in B16 (B16-F1, B16-F10) murine melanoma cell lines.** B16 melanoma cell lines are very interesting models for tumour biology studies. Compared with B16-F1, which has low metastatic potential, B16-F10 cell line displays a higher metastatic capacity (Fidler, 1973; Morris *et al.*, 2015). Translationally controlled tumour protein levels are markedly higher in B16-F10 cells (Figure 3A). A q-PCR analysis revealed that expression of TCTP mRNA in B16-F10 cells was 2.3-fold higher than that in

B16-F1 cells (Figure 3B). A knockdown (siRNA) of TCTP was performed and the transfectants were analysed by qRT-PCR after 24, 48, and 72 h (Figure 3C). A decrease of 50–70% in the amount of TCTP mRNA was observed and confirmed by the protein levels detected in the western blot assays (Figure 3D).

**Effects of TCTP inhibition in B16-F10 cell viability, proliferation, and migration.** The inhibition of TCTP by siRNA in the B16 cells slightly affected the viability and proliferation of these cells. A decrease of 15% and 25% in viability was observed after, respectively, 24 and 72 h of transfection (Figure 4A). The proliferation was reduced by 20% and 40% (Figure 4B). When the migration of these cells was evaluated by transwell, a substantial decrease in the migration potential of the TCTP-silenced cells was observed (Figure 4C). The number of cells that reached the other side of the well membrane was 53% and 67% smaller when TCTP was inhibited after 48 h and 72 h of transfection. The migration of TCTP knockdown cells was lower than the one observed for B16-F1 cells (Figure 4C).

**In vitro effects of sertraline on B16-F10 cells.** The effect of sertraline on the downregulation of TCTP was initially assessed by western blot analysis. B16-F10 melanoma cells were treated with sertraline at different concentrations (0.01, 0.1, and 1  $\mu\text{M}$ ). Translationally controlled tumour protein levels were evaluated after 24, 48, and 72 h (Figure 5A). The observed decrease of TCTP levels by sertraline is time and concentration dependent. Sertraline



**Figure 4.** Silencing TCTP by siRNA in B16-F10 melanoma cells: viability, proliferation, and migration. **(A)** Cell viability was determined using Trypan blue exclusion assay. B16-F1, B16-F10, and B16-F10 cells transfected using tpt1/TCTP siRNA (50 nM) and negative control (control siRNA) were plated ( $5 \times 10^4$  cells) in 24-well plates. After 24, 48, and 72 h, cells were stained with Trypan blue and counted in a haemocytometer. Data were statistically analysed by comparing the viability of the cell lines transfected with tpt1/TCTP siRNA and the negative control using one-way ANOVA with Tukey's *post hoc* test. Two independent experiments were performed ( $n=5$ ) (\*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ , and \*\*\*\* $P<0.0001$ ). **(B)** Cell proliferation by Crystal violet staining. B16-F1, B16-F10, and B16-F10 cells transfected using tpt1/TCTP siRNA (50 nM) and negative control (10<sup>4</sup> cells per well in 96-well plates). At 24, 48, and 72 h after transfection, cells were fixed and stained, and the absorbance was measured at 550 nm. Data were statistically analysed by comparing the lines transfected with tpt1/TCTP siRNA and the negative control using two-way ANOVA with Tukey's *post hoc* test. Two independent experiments were performed ( $n=5$ ) (\* $P<0.1$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\*\* $P<0.0001$ ). **(C)** Migration assay by Transwell. The migratory potential of the B16 cell lines was determined by assays on 8  $\mu$ m transwell culture chambers (Corning). A total of  $5 \times 10^4$  cells (B16-F1, B16-F10, and B16-F10 transfected using 50 nM tpt1/TCTP siRNA or control siRNA) with serum-free medium were plated on the top. Media with 10% of fetal bovine serum were used as a chemoattractant in the bottom. After incubation, the cells were fixed, stained and counted. Data were analysed using one-way ANOVA using Tukey's *post hoc* test. Three independent experiments were performed ( $n=3$ ) (\*\*\*\* $P<0.0001$ ).

at the concentration of 1  $\mu$ M markedly reduces the intracellular TCTP levels. Even the lower dose (0.01  $\mu$ M) was able to significantly decrease the amount of TCTP after 72 h of treatment. Figure 5B shows the results of TCTP relative expression by qRT-PCR in B16-F10 cells treated with sertraline. These results show that TCTP mRNA levels were diminished by sertraline in a time- and concentration-dependent manner. Viability was assessed by measuring the metabolic active cells after 24, 48, and 72 h of treatment (Figure 5C). Even low concentrations of sertraline triggered a significant decrease of the viability after 48 and 72 h. The capacity of murine melanoma cell to form colonies in a semisolid medium was evaluated in the presence of sertraline (Figure 5D). Sertraline reduced the number of colonies to 76% (0.1  $\mu$ M), 48% (1  $\mu$ M), and 32% (5  $\mu$ M), when compared with the control. Interestingly, 5  $\mu$ M of sertraline made B16-F10 cells even less clonogenic than B16-F1 cells.

**In vivo effects of sertraline treatment on C57BL/6/B16-F10 mice model.** The *in vivo* antitumour activity of sertraline was evaluated using C57BL/6 mice in which subcutaneous B16-F10 melanoma cells were inoculated (Figure 6). At 5 days after the cells were injected in the mice, sertraline/DTIC daily intraperitoneal treatment was started. At this point, a very small but palpable tumour could be observed. Animals were treated for 12 days with DTIC (60 mg kg<sup>-1</sup>) and/or sertraline (10 mg kg<sup>-1</sup>). Control animals were treated with the drug solvent (DMSO and/or water). At the end of the experiment, tumours were excised and their weights were determined (Figures 6A and B). Sertraline (10 mg kg<sup>-1</sup>) inhibited tumour growth by 84.4%. When animals were treated with both sertraline and DTIC, tumour growth was reduced to 88%. A stronger antitumour effect of sertraline could be observed when compared with DTIC singly treatment (47% tumour growth inhibition). However, when the suppression of tumour growth of

DTIC and sertraline is compared with sertraline alone, there is no increase in the antitumour activity of sertraline. Translationally controlled tumour protein content in these mice tumours was assessed by western blot analysis and a marked decrease could be observed. As expected, P53 levels were increased in tumours from animals treated with sertraline (Figure 6C). Collected tumours were also evaluated regarding the amount of TCTP, Ki67, caspase-3, and P53 by immunohistochemistry (Figure 6D). In line with the results observed by western blot analysis, tumours from animals treated with sertraline presented lower levels of TCTP and higher levels of P53 protein. Collectively, these results indicate that B16-F10 cells show a decrease in TCTP and malignant status, both *in vitro* and *in vivo* when treated with sertraline.

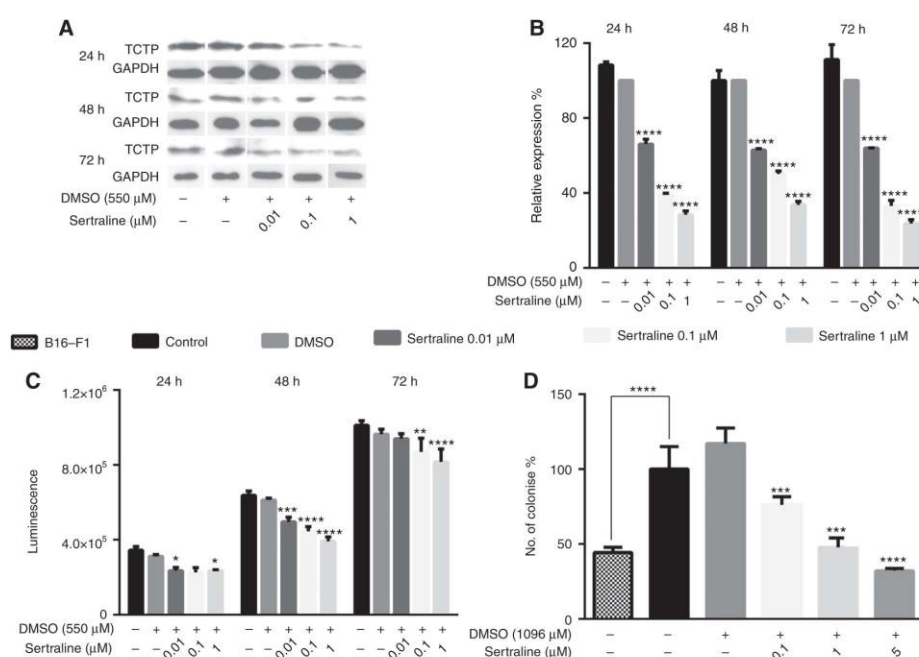
## DISCUSSION

Melanoma is the deadliest of skin cancers, caused by the transformation of melanocytes that accumulate genetic alterations, leading to abnormal proliferation and dissemination (Bastian, 2014). The incidence of melanoma is rising all over the world and an effective treatment for advanced cases is still to be determined. Despite improvements, metastatic melanoma (stage IV) is still associated with a poor prognosis and a median survival of 6–12 months (Schadendorf *et al*, 2015).

Melanoma tumours and cell lines overexpress TCTP (Tuynder *et al*, 2004; Baylot *et al*, 2012; Sade *et al*, 2012). Translationally controlled tumour protein is involved in fundamental cellular processes, such as cell cycle, proliferation, and apoptosis (Amson *et al*, 2013; Thebault *et al*, 2016).

In tumour reversion, a cellular reprogramming, with a marked decrease in malignancy, more than 300 genes are involved





**Figure 5.** Effect of sertraline on TCTP expression levels: evaluation of cell viability and colony formation. **(A)** Western blot analysis of TCTP and GAPDH protein levels in B16-F10 cells treated with sertraline (0.01, 0.1, and 1 μM) and a negative control (24, 48, and 72 h). Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase was used as an endogenous control for each sample. **(B)** Analysis of TCTP relative expression using qRT-PCR in B16-F10 cell line after treatment with sertraline (0.01, 0.1, and 1 μM at 24, 48, and 72 h), a negative control (dimethyl sulphoxide (DMSO)) and only medium in soft agar. The  $\Delta\Delta C_t$  method was used for quantification of the TCTP mRNA levels, using GAPDH as an endogenous standard for each sample. For graphics,  $\Delta\Delta C_t$  was normalised to the controls. Data were analysed by comparing the lines treated with sertraline and the negative control (DMSO) using one-way ANOVA test with Tukey's post hoc test. Two independent experiments were performed ( $n=5$ ) (\*\*\*\* $P<0.0001$ ). **(C)** Cell viability was determined using Cell Titer-Glo (Promega). B16-F10 cells were plated in 96-well plates ( $10^4$  cells per well) and treated with sertraline (0.01, 0.1, and 1 μM), DMSO (negative control) and only medium in soft agar. After 24, 48, and 72 h, Cell Titer-Glo reagent was added in the medium and luminescence was measured by Tecan (Tecan Infinite M200). Data were analysed by comparing the lines treated with sertraline and the negative control (DMSO) using two-way ANOVA test with Tukey's post hoc test. Two independent experiments were performed ( $n=5$ ) (\* $P<0.1$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ , and \*\*\*\* $P<0.0001$ ). **(D)** Clonogenic assay. A total of  $5 \times 10^3$  B16-F10 cells were incubated with sertraline (0.1, 1, and 5 μM), DMSO (negative control) and only medium in soft agar. After 15 days, cells were stained with Crystal violet and colonies were counted. Four independent experiments were performed ( $n=2$ ) (\*\*\* $P<0.001$ , \*\*\*\* $P<0.0001$ ).

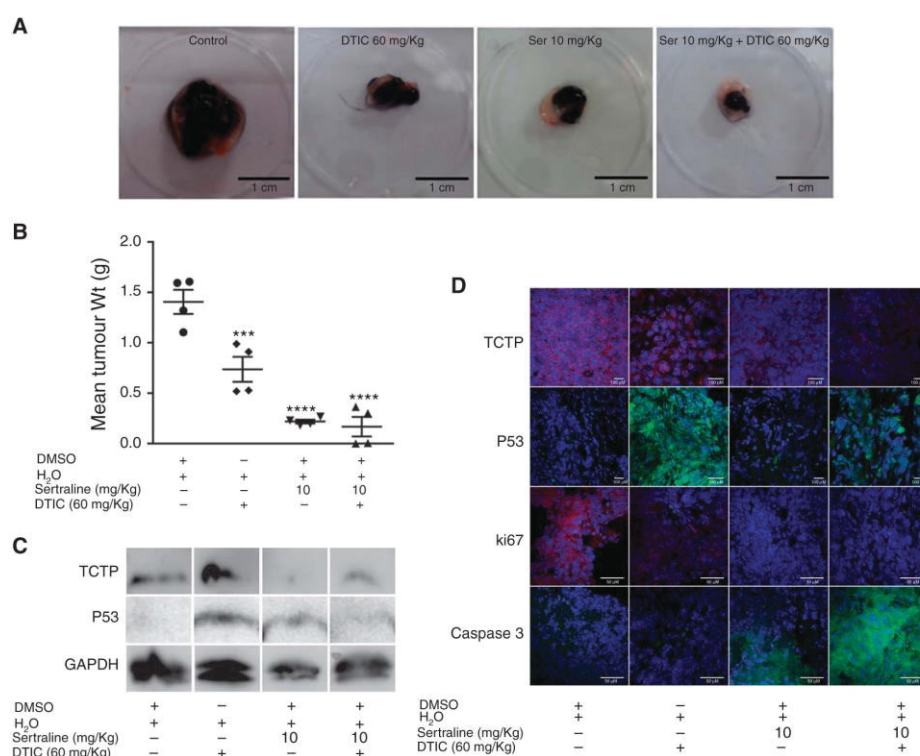
including TCTP (Tuynder *et al*, 2002). Accumulating data on TCTP and tumour reversion suggest that such a reprogramming could be clinically interesting and a therapeutic target for cancer treatment, overcoming regular drawbacks of standard procedures as resistance by clone selection (Tuynder *et al*, 2002, 2004; Telerman and Amson, 2009; Amson *et al*, 2013; Powers and Pollack, 2016).

Relevance of TCTP for tumour reversion in melanoma was shown by Tuynder *et al* (2004) in WM-266-4, WM-115, SK-MEL-28 and Hs852T cell lines, and human tumours. Using an oncolytic virus (H1 parvovirus), revertant cells were isolated from these melanoma cells. These revertant clones presented decreased TCTP levels and reduced tumorigenicity *in vivo*. Translationally controlled tumour protein was also implicated to the development of chemoresistance in melanoma (Sinha *et al*, 2000). MeWo cells induced to resistance by drugs presented higher TCTP levels when compared with their sensitive-counterparts. Mewo cell lines chemoresistant to cisplatin, vindesine, etoposide or fotemustine presented marked TCTP overexpression when compared with the parental cell line MeWo.

Both MeWo and A2058 cells showed reduced levels of TCTP when treated with sertraline. This decrease in TCTP was

accompanied by an increase in P53 levels (Figures 1 and 2). The decrease in the migration phenotype and also in the capacity of forming colonies caused by sertraline was striking in both human cell lines.

We took B16 melanoma a model to study TCTP. From B16 cells, different phenotypic cell lines were established: B16-F10, which is highly malignant and metastatic, and B16-F1, less proliferative with a lower metastatic capacity (Fidler, 1973; Morris *et al*, 2015). When TCTP levels were assessed in these cell lines, a marked difference was observed. The smaller content of TCTP protein in B16-F1 was consistent with low TCTP mRNA levels. In comparison with B16-F10 levels, B16-F1 presented half of the TCTP protein and mRNA content (Figure 3). The results suggest that knockdown of TCTP correlated with a decrease in malignant features of B16-F10 cells (Figure 4). These results are similar to those of WM266, in which decreased TCTP levels result in decreased tumour development (Tuynder *et al*, 2004). Most striking is the reduced migration capacity of F10 melanoma cells silenced for TCTP, which is even lower than B16-F1 (Figure 4C). Recently, the knockdown of TCTP was shown to reduce B16-F10 cells' capacity to form pulmonary metastasis *in vivo* (Bae *et al*, 2015). Sertraline (even at the lowest dose: 0.01 μM) was very



**Figure 6.** *In vivo* effect of sertraline on melanoma murine model. The C57BL/6 mice were subcutaneously injected with B16-F10 melanoma cells ( $5 \times 10^5$  cells). Daily intraperitoneal treatment with DTIC ( $60 \text{ mg kg}^{-1}$ ) and/or sertraline ( $10 \text{ mg kg}^{-1}$ ) was started on the fifth day after the cells were injected in the mice. Negative controls were treated with water and/or dimethyl sulphoxide (DMSO). **(A)** Representative images from tumours excised after 17 days. **(B)** Weights from tumours were determined and data were analysed by comparing the animal treated with DTIC, sertraline and sertraline/DTIC. The negative control was analysed using t-test. Three independent experiments were performed ( $n=5$ ) ( $***P<0.001$  and  $****P<0.0001$ ). **(C)** Western blot analysis of TCTP, P53, and GAPDH protein levels in tumour samples after treatment with DTIC and/or sertraline and negative control. Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase was used as an endogenous control for each sample. **(D)** Immunohistochemistry (IHC) of TCTP, Ki67, caspase-3, and P53 obtained from B16-F10 tumours. Tumour sections obtained from B16-F10 tumours from the DTIC- and/or sertraline-treated mice or -untreated ( $\text{H}_2\text{O}$  and/or DMSO). Sample sections were incubated with primary antibodies against TCTP (1:1000), Ki67 (1:1000), caspase-3 (1:1000), and P53 (1:1000). Protein expression was detected by immunohistochemistry using a secondary antibody conjugated to FITC (P53 and caspase-3) (1:250) or Alexa Fluor 594 (TCTP and Ki67) (1:250). Images were merged with a 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) channel. The scale bars are visualised on the right.

effective in the reducing TCTP levels (Figure 5). Sertraline was effective in reducing the capacity of melanoma cells to form colonies in soft agar. The results concerning the reduction of migration and clonogenic capacity are quite interesting in the context of melanoma as this tumour type is very metastatic, and difficult to treat when disseminated (Shain and Bastian, 2016).

Results of sertraline treatment using the *in vivo* model are very promising (Figure 6). Although new treatment strategies are being developed against melanoma (mainly targeting specific mutations and others based on immune therapy), DTIC is still the main chemotherapy drug. However,  $10 \text{ mg kg}^{-1}$  of sertraline triggered a marked inhibition of tumour growth, which was better than DTIC ( $60 \text{ mg kg}^{-1}$ ). We observed a decrease in TCTP and an increase in P53 levels in the tumours of the animals treated by sertraline (Figure 6C). Dacarbazine also triggered an increase in P53 levels, because of its action on DNA. These results point to a complex reprogramming of tumour cells by sertraline, suggesting its mechanism of action goes further than reactivation of P53. Sertraline also induced a decrease in Ki67 levels and an increase in caspase-3 levels (Figure 6D).

Translationally controlled tumour protein had already been described as a cell survival protein, modulating apoptosis (Amson *et al*, 2012; Acunzo *et al*, 2014; Thebault *et al*, 2016). Reciprocal repression of TCTP-P53 is particularly interesting in the context of melanoma because of its wild-type p53 status prevalence. Although p53 tumour suppressor gene is rarely mutated in melanoma, its functional attenuation is needed for tumour development. Reactivation of p53 was already pointed as an alternative therapeutic strategy for melanoma treatments, in combination with other strategies (Jochemsen, 2014; Lu *et al*, 2014).

The underlying mechanism of sertraline is based on its direct interaction with TCTP. Translationally controlled tumour protein's function on the autoubiquitination of MDM2 is hereby impaired, resulting in the increase of P53 levels (Amson *et al*, 2012).

Our results suggest that sertraline effects are related not only to P53 activation and induction of apoptosis but also to a more complex pathway, which probably enable cells to suppress tumour features. When sertraline treatment of human melanoma cell lines was evaluated, we choose a p53 wild-type (MeWo) and a mutant p53



(A2058) cell line (TP53 web site: <http://p53.fr>) (Figures 5 and 6). Sertraline effects were quite similar in both cell lines; migration and clonogenicity were markedly reduced. Translationally controlled tumour protein levels decreased and P53 increased by sertraline, even in the p53 mutant cell line (A2058). As TCTP is a multifunctional protein with several partners, involved in crucial cell pathways, the decrease of TCTP levels probably influence other molecules than P53, leading to a complex alteration of cell behaviour and to tumour reversion. However, a specific and detailed mechanism remains elusive.

It is important to highlight TCTP as a target for melanoma therapy in a context of cellular reprogramming and tumour reversion, as the decrease of TCTP levels lead to the loss of tumour features such as migration, clonogenicity, strongly associated with metastatic disease and tumour growth *per se*.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The present study was supported by grants from CAPES-COFECUB (866/15), CNPq, and FA-PR. We thank Professors Rubens Bertazoli Filho, Sheila MB Winnischofer, and Glauca R Martinez for all the suggestions and precious advices; Professor Silvio Marques Zanata for his constant support; Professor Michel Otuki for pharmacological advice concerning evaluation of the sertraline and dacarbazine combination effect, and Professor Marcelo M Santos Lima for his contribution with regard to Amersham Imager 600 equipment. MBF is supported by a CNPq PhD scholarship (proc.140747/2014-1).

## CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

## DISCLAIMER

As the corresponding author, I declare that all named authors have read the manuscript and have agreed to this manuscript (TH-2017-4183R) in its present form. These research data have not been and will not be submitted to another journal, in whole or in part. This manuscript reports previously unpublished work. All those named as authors have made important and sufficient contribution to the work.

## ETHICAL CONSIDERATIONS

We have observed appropriate ethical guidelines and legislation in conducting the animal studies described in this Manuscript. All procedures involving animals were performed in accordance with Brazilian Federal Laws, in accordance with the Ethical Subcommittee on Research Animal Care Agreement number 730 of the Federal University of Paraná. The protocols applied in carrying out the investigations require a high standard of ethics and are in agreement with the Ethical Principles established by Experimental Animal Brazilian Council (COBEA), and with the requirement of the 'Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)'.

## REFERENCES

Acunzo J, Baylot V, So A, Rocchi P (2014) TCTP as therapeutic target in cancers. *Cancer Treat Rev* **40**(6): 760–769.

- Ambrosio MR, Rocca BJ, Barone A, Onorati M, Mundo L, Crivelli F, Di Nuovo F, De Falco G, del Vecchio MT, Tripodi SA, Tosi P (2015) Expression of translationally controlled tumor protein in human kidney and in renal cell carcinoma. *BioMed Res Int* **2015**: 730390.
- Amson R, Karp JE, Telerman A (2013) Lessons from tumor reversion for cancer treatment. *Curr Opin Oncol* **25**(1): 59–65.
- Amson R, Pece S, Lespagnol A, Vyas R, Mazzarol G, Tosoni D, Colaluca I, Viale G, Rodrigues-Ferreira S, Wynendaele J, Chaloin O, Hoebeke J, Marine JC, Di Fiore PP, Telerman A (2012) Reciprocal repression between P53 and TCTP. *Nat Med* **18**(1): 91–99.
- Bae SY, Kim HJ, Lee KJ, Lee K (2015) Translationally controlled tumor protein induces epithelial to mesenchymal transition and promotes cell migration, invasion and metastasis. *Scientific Rep* **5**: 8061.
- Bastian BC (2014) The molecular pathology of melanoma: an integrated taxonomy of melanocytic neoplasia. *Annu Rev Pathol* **9**: 239–271.
- Baylot V, Katsogiannou M, Andrieu C, Taieb D, Acunzo J, Giusiano S, Fazli L, Gleave M, Garrido C, Rocchi P (2012) Targeting TCTP as a new therapeutic strategy in castration-resistant prostate cancer. *Mol Ther* **20**(12): 2244–2256.
- Borges BE, Teixeira VR, Appel MH, Steclan CA, Rigo F, Filipak Neto F, da Costa Ferreira AM, Chammas R, Zanata SM, Nakao LS (2013) *De novo* galectin-3 expression influences the response of melanoma cells to isatin-Schiff base copper (II) complex-induced oxidative stimulus. *Chemo-biol Interact* **206**(1): 37–46.
- Chung S, Kim M, Choi W, Chung J, Lee K (2000) Expression of translationally controlled tumor protein mRNA in human colon cancer. *Cancer Lett* **156**(2): 185–190.
- Coogan PF, Strom BL, Rosenberg L (2009) Antidepressant use and colorectal cancer risk. *Pharmacoepidemiol Drug Saf* **18**(11): 1111–1114.
- Fidler IJ (1973) Selection of successive tumour lines for metastasis. *Nat New Biol* **242**(118): 148–149.
- Jochemsen AG (2014) Reactivation of p53 as therapeutic intervention for malignant melanoma. *Curr Opin Oncol* **26**(1): 114–119.
- Kozioł MJ, Gurdon JB (2012) TCTP in development and cancer. *Biochem Res Int* **2012**: 105203.
- Lu M, Miller P, Lu X (2014) Restoring the tumour suppressive function of p53 as a parallel strategy in melanoma therapy. *FEBS Lett* **588**(16): 2616–2621.
- Morris VL, Toseef T, Nazumudeen FB, Rivoira C, Spatafora C, Tringali C, Rotenberg SA (2015) Anti-tumor properties of *cis*-resveratrol methylated analogs in metastatic mouse melanoma cells. *Mol Cell Biochem* **402**(1–2): 83–91.
- Powers S, Pollack RE (2016) Inducing stable reversion to achieve cancer control. *Nature* **16**: 266–270.
- Pretto E, Neri D (2013) Pharmacotherapy of metastatic melanoma: emerging trends and opportunities for a cure. *Pharmacol Ther* **139**(3): 405–411.
- Reynolds A, Leake D, Boese Q, Scaringe S, Marshall WS, Khvorovova A (2004) Rational siRNA design for RNA interference. *Nat Biotechnol* **22**(3): 326–330.
- Rocca BJ, Ginori A, Barone A, Calandra C, Crivelli F, De Falco G, Gazaneo S, Tripodi S, Cevenini G, del Vecchio MT, Ambrosio MR, Tosi P (2015) Translationally controlled tumor protein in prostatic adenocarcinoma: correlation with tumor grading and treatment-related changes. *BioMed Res Int* **2015**: 985950.
- Sade YB, Boia-Ferreira M, Gremski LH, da Silveira RB, Gremski W, Senff-Ribeiro A, Chaim OM, Veiga SS (2012) Molecular cloning, heterologous expression and functional characterization of a novel translationally-controlled tumor protein (TCTP) family member from *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. *Int J Biochem Cell Biol* **44**(1): 170–177.
- Schadendorf D, Fisher DE, Garbe C, Gershenwald JE, Grob JJ, Halpern A, Herlyn M, Marchetti MA, McArthur G, Ribas A, Roesch A, Hauschild A (2015) Melanoma. *Nat Rev Dis Primers* **1**: 15003.
- Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW (2012) NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature methods* **9**(7): 671–675.
- Shain AH, Bastian BC (2016) From melanocytes to melanomas. *Nat Rev Cancer* **16**(6): 345–358.
- Sinha P, Kohl S, Fischer J, Hutter G, Kern M, Kottgen E, Dietel M, Lage H, Schnolzer M, Schadendorf D (2000) Identification of novel proteins associated with the development of chemoresistance in malignant melanoma using two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis* **21**(14): 3048–3057.
- Spandidos A, Wang X, Wang H, Seed B (2010) Primer Bank: a resource of human and mouse PCR primer pairs for gene expression detection and quantification. *Nucleic Acids Res* **38**: 792–799.

- Telerman A, Amson R (2009) The molecular programme of tumour reversion: the steps beyond malignant transformation. *Nat Rev Cancer* **9**(3): 206–216.
- Thebault S, Agez M, Chi X, Stojko J, Cura V, Telerman SB, Maillet L, Gautier F, Billas-Massobrio I, Birck C, Troffer-Charlier N, Karafin T, Honore J, Senff-Ribeiro A, Montessuit S, Johnson CM, Juin P, Cianferani S, Martinou JC, Andrews DW, Amson R, Telerman A, Cavarelli J (2016) TCTP contains a BH3-like domain, which instead of inhibiting, activates Bcl-xL. *Scientific Rep* **6**: 19725.
- Toh S, Mitchell AA, Louik C, Werler MM, Chambers CD, Hernandez-Diaz S (2009) Selective serotonin reuptake inhibitor use and risk of gestational hypertension. *Am J Psychiatry* **166**(3): 320–328.
- Tuynder M, Fiucci G, Prieur S, Lespagnol A, Geant A, Beaucourt S, Duflaut D, Besse S, Susini L, Cavarelli J, Moras D, Amson R, Telerman A (2004) Translationally controlled tumor protein is a target of tumor reversion. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**(43): 15364–15369.
- Tuynder M, Susini L, Prieur S, Besse S, Fiucci G, Amson R, Telerman A (2002) Biological models and genes of tumor reversion: cellular reprogramming through tpt1/TCTP and SLAH-1. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**(23): 14976–14981.
- Wernli KJ, Hampton JM, Trentham-Dietz A, Newcomb PA (2009) Antidepressant medication use and breast cancer risk. *Pharmacoepidemiol Drug Saf* **18**(4): 284–290.
- Xu W, Tamim H, Shapiro S, Stang MR, Collet JP (2006) Use of antidepressants and risk of colorectal cancer: a nested case-control study. *Lancet Oncol* **7**(4): 301–308.

This work is published under the standard license to publish agreement. After 12 months the work will become freely available and the license terms will switch to a Creative Commons Attribution-NonCommercial-Share Alike 4.0 Unported License.

### 1.5.2 Resultados não publicados

A fim de observar o comportamento das células após a retirada do tratamento com sertralina, as células de melanoma A2058, MeWo e B16-F10 foram submetidas ao tratamento com 1 $\mu$ M de sertralina. Após 72 horas o tratamento foi retirado e as células subcultivadas por cinco dias em condições regulares para então serem plaqueadas e analisadas. O objetivo destes experimentos foi avaliar a capacidade do tratamento com sertralina de induzir a reversão tumoral, promovendo a perda do fenótipo maligno de forma estável e duradoura.

Na figura 9 podemos observar que após a remoção do tratamento com sertralina as células MeWo ainda apresentavam níveis reduzidos da TCTP se comparada as células do controle DMSO (Figura 9A). Além disso essas células apresentavam uma redução significativa na proliferação celular (Figura 9B) e menor capacidade de formação de colônias *in vitro* (Figura 9C). Houve uma redução de aproximadamente 15 e 30% na proliferação das células após 48 e 72 horas do plaqueamento, respectivamente. Além disso as células previamente tratadas foram capazes de formar cerca de 50% menos de colônias se comparada as células controle.

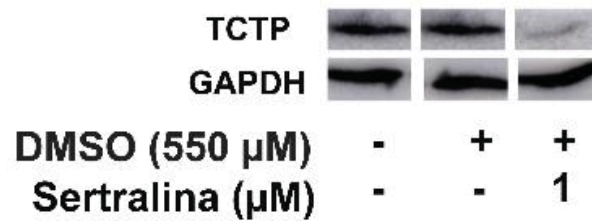
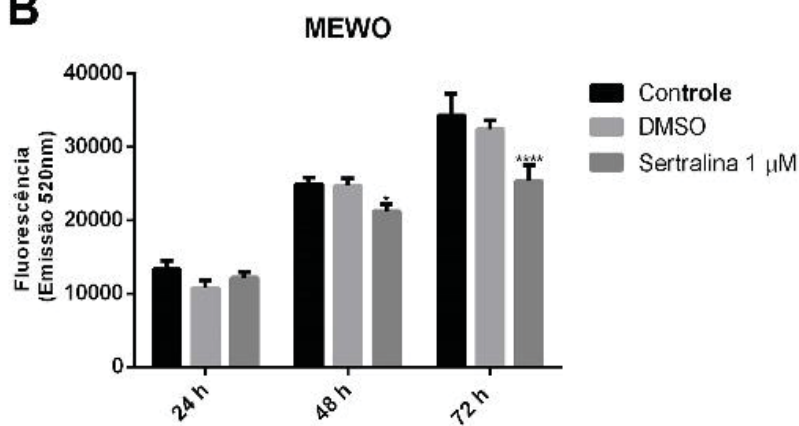
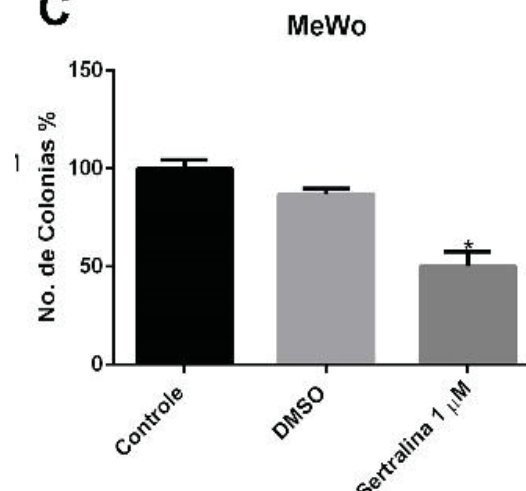
**A****B****C**

Figura 9: **Avaliação do Efeito de Reversão da Sertralina sobre as Células de Melanoma Humano MeWo.** A- Imunodeteção da TCTP e GAPDH nos extratos proteicos após tratamento com sertralina e/ ou controles. B- Ensaio de Proliferação Celular com Cristal Violeta. As células previamente tratadas (1 μM de sertralina por 72 horas e depois 5 dias de cultivo em condições regulares) foram plaqueadas e após 24, 38 e 72 horas foram fixadas, coradas e absorbância medida em 550 nM. C- Ensaio de Clonogenicidade em ágar mole. As células previamente tratadas foram plaqueadas em ágar mole. Após 20 dias foram coradas com cristal violeta e as colônias contadas em microscópio invertido.

Em relação a linhagem de melanoma humano A2058 (Figura 10), não foi possível observar uma redução nos níveis da TCTP por imunodeteção (Figura 10A). Porém, as células pré-tratadas proliferaram menos e sua capacidade clonogênica em meio semi- sólido foi menor do que as células controle DMSO. A redução da proliferação foi semelhante a encontrada para o melanoma humano MeWo, cerca de 15 e 30% respectivamente (Figura 10B). Em relação a formação de colônias houve uma redução de aproximadamente 40%, sendo essa significativa em relação aos controles (Figura 10C).

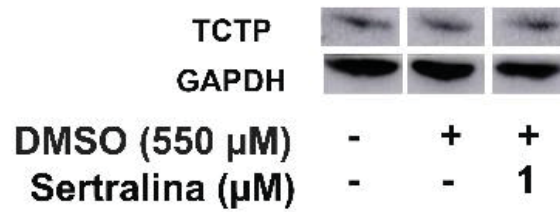
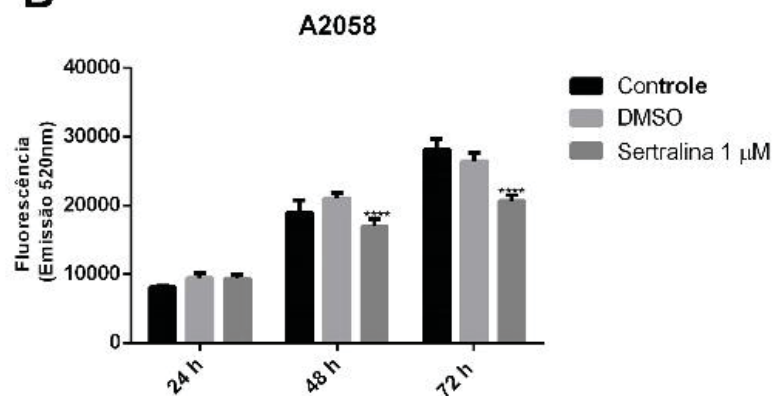
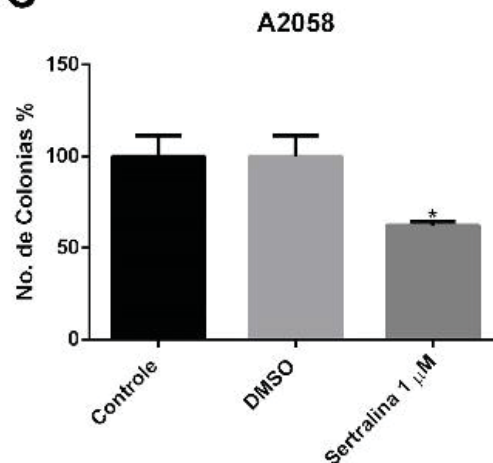
**A****B****C**

Figura 10: **Avaliação do Efeito de Reversão da Sertralina sobre as Células de Melanoma Humano A2058.** A- Imunodeteção da TCTP e GAPDH nos extratos proteicos após tratamento com sertralina e/ ou controles. B- Ensaio de Proliferação Celular com Cristal Violeta. As células previamente tratadas (1  $\mu$ M de sertralina por 72 horas e depois 5 dias de cultivo em condições regulares) foram plaqueadas e após 24, 38 e 72 horas foram fixadas, coradas e absorvância medida em 550 nm. C- Ensaio de Clonogenicidade em ágar mole. As células previamente tratadas foram plaqueadas em ágar mole. Após 20 dias foram coradas com cristal violeta e as colônias contadas em microscópio invertido.

Em relação ao efeito prolongado em melanoma murino B16F10 (Figura 11), as células previamente tratadas apresentaram níveis reduzidos da TCTP mesmo após 5 dias de finalizada a exposição à sertralina (Figura 11A). Além disso foram capazes de reduzir a proliferação em aproximadamente 15% em todos os tempos testados (Figura 11B). Em relação ao potencial clonogênico, as células expostas à sertralina, mesmo após um período de 5 dias sem tratamento mantiveram a inibição de formação de colônias, formando 25% de colônias a menos quando comparada ao controle DMSO (Figura 11C).



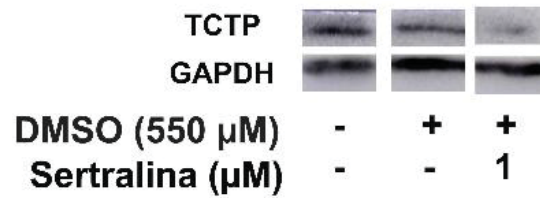
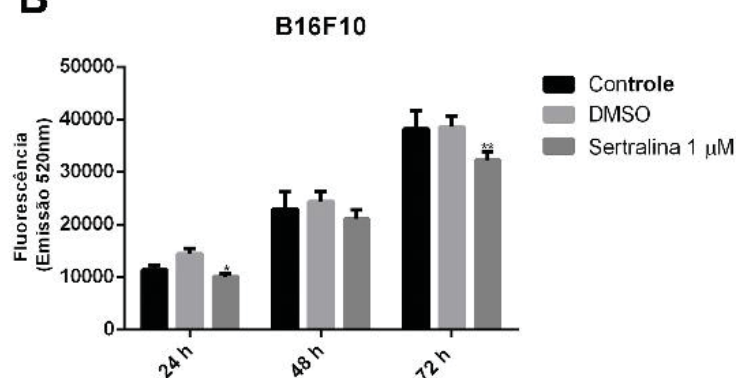
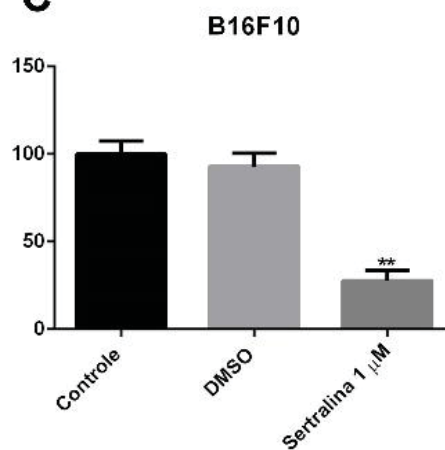
**A****B****C**

Figura 11: **Avaliação do Efeito de Reversão da Sertralina sobre as Células de Melanoma Humano B16F10.** A- Imunodeteção da TCTP e GAPDH nos extratos proteicos após tratamento com sertralina e/ ou controles (1  $\mu$ M de sertralina por 72 horas e depois 5 dias de cultivo em condições regulares). B- Ensaio de Proliferação Celular com Cristal Violeta. As células previamente tratadas foram plaqueadas e após 24, 38 e 72 horas foram fixadas, coradas e absorbância medida em 550 nm. C- Ensaio de Clonogenicidade em ágar mole. As células previamente tratadas foram plaqueadas em ágar mole. Após 20 dias foram coradas com cristal violeta e as colônias contadas em microscópio invertido.



A fim de comparar os tumores formados pelas células previamente tratadas, foi realizado ensaio de crescimento tumoral *in vivo* utilizando camundongos C57Bl6 (Figura 12). Para tanto as células B16F10 foram expostas a sertralina por três dias e o tratamento removido. As células foram então subcultivadas por 5 dias, em condições regulares, para então serem inoculadas por via subcutânea nos animais. Após 17 dias podemos observar que os tumores formados pelas células expostas à sertralina foram três vezes menores que aqueles formados pelas células expostas aos controles (meio e DMSO).

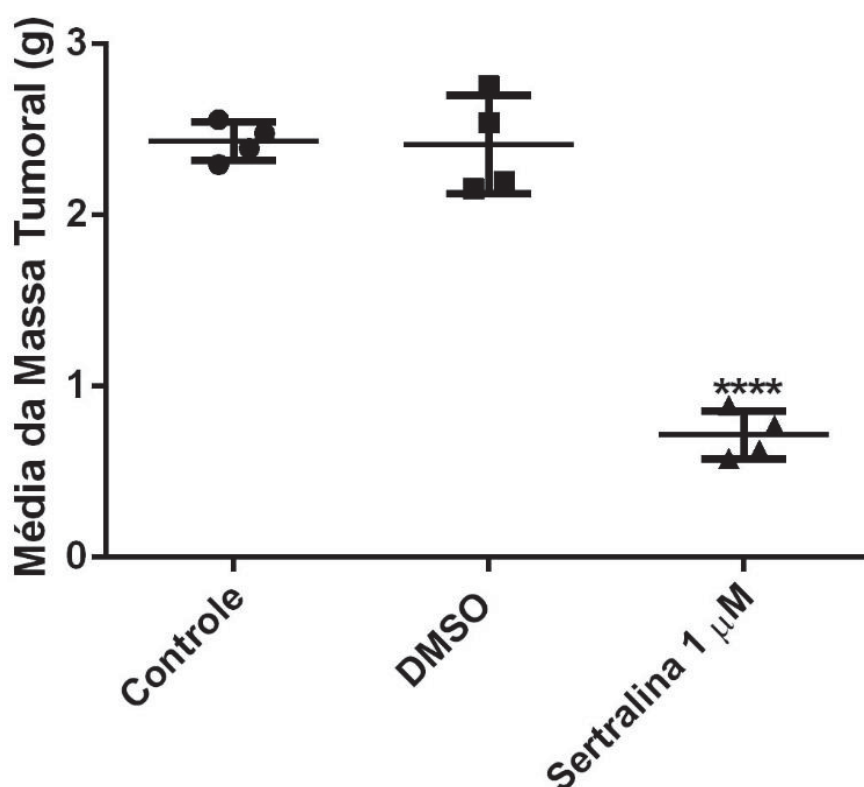


Figura 12: **Avaliação do Efeito de Reversão da Sertralina sobre o Crescimento Tumoral *in vivo***. Células B16F10 submetidas ao tratamento *in vitro* (1 µM de sertralina por 72 horas e depois 5 dias de cultivo em condições regulares) foram injetadas em camundongos C57Bl6. Após 17 dias os animais foram eutanasiados e os tumores pesados.

Dessa forma verificamos que o tratamento com sertralina é capaz de desencadear a reprogramação celular e a perda do fenótipo maligno de forma estável.

## 1.6 DISCUSSÃO

O melanoma é causado pela transformação de melanócitos que acumularam alterações genéticas, as quais levaram a uma proliferação anormal (Bastian, 2014). A incidência do melanoma é baixa, porém sua mortalidade é a mais alta dentre os tumores de pele e um tratamento efetivo ainda não foi determinado para os casos mais avançados. Dessa forma o melanoma metastático (estadio IV) ainda está associado a um baixo prognóstico e a média de sobrevida é de 6 a 12 meses (Schadendorf *et al.*, 2015).

Tumores de melanoma e linhagens celulares de melanoma superexpressam a TCTP (Tuynder *et al.*, 2004; Baylot *et al.*, 2012; Sade *et al.*, 2012). A proteína multifuncional TCTP está relacionada à proliferação celular, progressão do ciclo celular, inibição da apoptose e regulação da pluripotência (Amson *et al.*, 2012; Bommer, 2012; Chan, Chen, Liu, *et al.*, 2012; Amson, Karp, *et al.*, 2013; Acunzo *et al.*, 2014). Além disso, tem sido associada com tumores agressivos e metastáticos, sendo um fator de prognóstico negativo, relacionada a estágios tumorais avançados e ao baixo tempo de sobrevivência dos pacientes (Kim *et al.*, 2008; Niforou *et al.*, 2008; Zhu *et al.*, 2008; Slaby *et al.*, 2009).

O processo de reversão tumoral envolve um mecanismo de reprogramação das células tumorais. A seleção das células revertentes utilizando parvovírus revelou uma expressão diferencial de cerca de 300 genes, dentre eles do gene para TCTP (Tuynder *et al.*, 2002). As células revertentes perdem seu fenótipo maligno adquirindo características mais próximas as de uma célula normal. Essas células revertentes perdem as principais características de malignidade e apresentam baixa capacidade de originar tumores *in vivo*, se comparadas as suas células tumorais originais. Estudos utilizando células de câncer de mama (MCF7 e T47D) em sistema de cultura 3D em matrigel demonstraram que o silenciamento da TCTP levou a uma reorganização celular com crescimento e organização muito semelhante aos das células normais (estruturas em forma de ducto) (Tuynder *et al.*, 2002). Da mesma forma, a inibição da expressão da TCTP em fibroblastos transformados

resultou numa massiva redução do fenótipo maligno (Cans *et al.*, 2003; Langdon *et al.*, 2004; Telerman e Amson, 2009).

Dessa forma, os estudos da proteína TCTP e do processo de reversão tumoral sugerem que esta reprogramação celular possa ser uma estratégia clinicamente interessante, superando as desvantagens dos tratamentos convencionais como a seleção de clones resistentes e posterior ausência de resposta à terapia (Tuynder *et al.*, 2002; Tuynder *et al.*, 2004; Telerman e Amson, 2009; Amson, Karp, *et al.*, 2013; Powers e Pollack, 2016).

O papel da TCTP na reversão tumoral no melanoma em linhagens celulares de tumores humanos (WM-266-4, WM-115, SK-MEL-28 e Hs852T) já foi demonstrado (Tuynder *et al.*, 2004). Clones revertentes espontâneos dessas linhagens de melanoma foram isolados e apresentaram redução nos níveis da TCTP e redução da tumorigenicidade *in vivo*. Uma das formas já estudadas de se reduzir os níveis proteicos da TCTP é por meio da utilização de drogas como a sertralina. Inicialmente identificada devido a sua estrutura similar aos anti-histamínicos. Tuynder e colaboradores (2004) também avaliaram a capacidade da sertralina em diminuir os níveis da TCTP em linhagens de melanoma. Nesse estudo, evidenciou-se o efeito citopático *in vitro* da sertralina, sua capacidade de diminuir a quantidade da TCTP nas células e seu potencial de diminuição da tumorigênese e desenvolvimento tumoral *in vivo*.

Um estudo proteômico de células de melanoma MeWo quimioresistentes à cisplatina, vindesina, etoposide e fotemustina mostrou níveis aumentados da TCTP relacionados à resistência (Sinha *et al.*, 2000). Esse fato pode estar relacionado ao papel protetivo da TCTP (Bommer *et al.*, 2017). Os dados disponíveis na literatura apontavam para a importância da TCTP no melanoma e a sertralina como uma possibilidade terapêutica. Contudo, os dados eram restritos e não existia uma comparação entre sertralina e o tratamento clínico mais utilizado (quimioterapia com dacarbazina). Nossos resultados com as linhagens de melanoma humano, MeWo e A2058, são de redução dos níveis da TCTP após o tratamento com sertralina. Essa redução da TCTP foi acompanhada pelo aumento dos níveis de P53 (Figuras 1 e 2 do artigo). Além disso, podemos observar uma redução da migração celular e da capacidade de formar colônias em ambas linhagens tratadas com sertralina. Ambas as células

(MeWo e A2058), mesmo após a remoção da droga, apresentaram um efeito estável de redução das características tumorais: redução na proliferação celular e na capacidade de formação de colônias (Figuras 9 e 10), sugerindo que o tratamento com sertralina mesmo em baixa concentração e por período relativamente curto (72h) é capaz de induzir a reversão tumoral.

Nós também avaliamos o papel da TCTP na malignidade do melanoma murino B16. As células de melanoma murino, B16F10 e B16F1, apresentam perfis de agressividade e metastização diferentes, sendo B16F10 mais metastática. No trabalho realizado durante meu mestrado (Ferreira, 2014), evidenciamos que as células B16F10 apresentam níveis mais altos da TCTP que B16F1. Esta diferença de expressão da TCTP foi correlacionada com o perfil tumoral mais agressivo de F10, e confirmada por meio do silenciamento da TCTP (tecnologia de RNA de interferência). O gene *tpt1*, referente à proteína TCTP, foi silenciado em B16F10, resultando na diminuição da expressão da TCTP em aproximadamente 50%. Essa redução da TCTP alterou o perfil celular, diminuiu a proliferação (redução de aproximadamente 20%) e a migração (redução de aproximadamente 75%), quando comparadas com o controle. Desta forma, os resultados correlacionaram a quantidade da TCTP expressa ao fenótipo tumoral do melanoma murino da série B16 (Ferreira, 2014).

Esses resultados são similares aos encontrados por Tuynder (2004) utilizando a linhagem de melanoma humano WM266, nos quais a redução nos níveis da TCTP resultou na redução do desenvolvimento tumoral (Tuynder *et al.*, 2004). Recentemente, Bae e colaboradores silenciaram a TCTP em células B16F10 e observaram uma redução das metástases *in vivo*, utilizando camundongos C57BL6 (Bae *et al.*, 2015). No nosso estudo, a sertralina, mesmo em baixas doses (0,01  $\mu$ M) foi efetiva na redução dos níveis intracelulares da TCTP em B16F10 (Figura 1, 2 e 5 do artigo). Além disso, ela foi capaz de reduzir significativamente a capacidade das células de melanoma murino em originarem colônias em meio semi-sólido (*soft ágar*). Quando o tratamento com sertralina foi removido, as células cultivadas na ausência da droga por 5 dias e depois ensaiadas mantiveram um baixo potencial proliferativo e uma capacidade de formação de colônias reduzida, evidenciando

efeito da sertralina a longo prazo (Figura 11). Esses resultados corroboram com os resultados de migração celular obtidos durante o mestrado e tem grande relevância no contexto do melanoma, visto que esse tipo de tumor é altamente metastático, aspecto que dificulta seu tratamento (Shain e Bastian, 2016).

Os resultados *in vivo* utilizando a sertralina foram muito promissores (Figura 6 do artigo e Figura 12). Embora novas estratégias de tratamento para o melanoma tenham sido desenvolvidas recentemente (como drogas que atuam em proteínas com mutações específicas e imunoterapia), a dacarbazina (DTIC) ainda é o fármaco mais utilizado na clínica, para tratamento de quimioterapia. Podemos observar que a inibição do crescimento tumoral utilizando 10 mg/kg de sertralina foi superior à inibição gerada pelo tratamento com DTIC (60 mg/kg) isolada. A concentração de sertralina diária utilizada convertida para humanos através de extrapolação alométrica interespecífica seria aproximadamente 90 mg/dia, dose essa considerada segura e comumente indicada para pacientes com depressão (50-200 mg/dia) (Reagan-Shaw *et al.*, 2008; Hayasaka *et al.*, 2015). Observamos redução dos níveis da TCTP e um aumento de P53 nos tumores dos animais tratados com sertralina (Figura 6C do artigo). Já o tratamento com DTIC foi capaz de aumentar os níveis de P53, por esse quimioterápico atuar gerando dano ao DNA (Mishra *et al.*, 2018). Além disso, podemos observar que o tratamento com DTIC resultou num aumento dos níveis proteicos da TCTP. Isso pode estar relacionado ao efeito protetor da TCTP nas células tumorais (Sinha *et al.*, 2000; Bommer *et al.*, 2017). Esses resultados apontam a sertralina como uma droga com pronunciado efeito antitumoral. Além disso, células previamente tratadas com sertralina tiveram menor capacidade de originar tumores, mesmo após 5 dias em cultivo regular na ausência da droga (Figura 11). Um dos mecanismos de ação sugerido envolve a reativação de P53. A sertralina também foi capaz de reduzir os níveis de Ki67 (marcador de proliferação celular) e aumentar os níveis de caspase 3 (marcador de apoptose) (Figura 6D do artigo).

Considerando o aumento da expressão da TCTP em melanomas resistentes à quimioterapia (Sinha *et al.*, 2000), somado ao fato da sertralina ser capaz de reduzir os níveis intracelulares da TCTP (Tuynder *et al.*, 2004; Amson *et al.*, 2012; Amson, Pece, *et al.*, 2013) e, ainda, aliado ao fato do uso

combinado de quimioterápicos com a sertralina apresentar efeito superior ao do quimioterápico isolado (Amson, Pece, *et al.*, 2013), a estratégia de combinar a sertralina ao tratamento do melanoma se torna uma possibilidade terapêutica aplicável clinicamente. Essa estratégia visa reduzir os níveis da TCTP e assim aumentar os níveis de P53. Dessa forma o aumento de P53 pode reestabelecer o fenótipo normal ou induzir a morte celular de linhagens cancerosas. A reativação de P53 é apontada como uma estratégia terapêutica para tratamentos de melanoma, em combinação com outras estratégias (Jochemsen, 2014; Lu *et al.*, 2014).

Além disso, a linhagem A2058 apresenta mutação BRAF (V600E). As mutações em BRAF são encontradas em mais de 50% dos melanomas, e estão relacionadas a um prognóstico ruim. Essa proteína é responsável pela ativação da transcrição de diversas proteínas relacionadas à proliferação e diferenciação celular (Munoz-Couselo *et al.*, 2015). No nosso estudo, podemos verificar que a linhagem A2058, que apresenta mutações em p53 e BRAF, foi suscetível ao tratamento com sertralina. A linhagem apresentou redução de seus níveis da TCTP e diminuição da viabilidade, do potencial clonogênico e da migração com o tratamento, além de manter um perfil menos proliferativo e clonogênico após o fim de exposição à droga por um longo período. Portanto os resultados em A2058 sugerem que a sertralina pode ser efetiva em melanomas com a mutação em BRAF, responsável por um fenótipo mais maligno e agressivo.

A TCTP também é caracterizada como uma proteína relacionada à sobrevivência celular, modulando a apoptose (Amson *et al.*, 2012; Acunzo *et al.*, 2014; Thebault *et al.*, 2016). Amson e colaboradores mostraram que a sertralina inibe a expressão da TCTP por restaurar a expressão da proteína P53. O tratamento com a sertralina promove a ligação de P53 ao elemento responsivo a p53 na região promotora da TCTP, levando a inibição da transcrição do mRNA da TCTP e ativação de TSAP6 que promove a secreção da TCTP em exossomos. A sertralina é capaz de ligar-se diretamente à TCTP, prevenindo a ligação da TCTP a MDM2 e reduzindo a ubiquitinação de P53 (Amson *et al.*, 2012; Acunzo *et al.*, 2014). Dessa forma a repressão recíproca entre TCTP e P53 é particularmente interessante como estratégia terapêutica e ainda não havia sido evidenciada em melanoma.

Além disso, estudos recentes já demonstraram um papel importante dos inibidores de receptação de serotonina (SSRI) contra uma variedade de neoplasias e caracterizaram os mecanismos moleculares pelos quais os antidepressivos atuam contra as células cancerosas. Os SSRIs são indicados para o tratamento da depressão, mas também são efetivos para transtorno bipolar, pânico, distúrbio obsessivo-compulsivo (Greist *et al.*, 1995), fobia social, ansiedade generalizada (Gorman, 2003), entre outros. O seu mecanismo de ação como antidepressivo é bem conhecido, eles atuam inibindo seletivamente a receptação de serotonina na fenda sináptica, potencializando a neurotransmissão serotoninérgica. Segundo Bottino e colaboradores (2009) a depressão é a desordem psiquiátrica mais comum em pacientes com câncer (22-29% de prevalência). Foi evidenciado efeito direto desses compostos contra as células tumorais (Bottino *et al.*, 2009). Também foi observado que as células linfoides expressam o receptor de serotonina e que três SSRIs - fluoxetina, paroxetina e citalopram- atuam diretamente nas células do linfoma de Burkitt, induzindo-as à apoptose (Serafeim *et al.*, 2002). Em melanoma, a baixa responsividade ao tratamento pode estar relacionada a Akt, uma proteína constitutiva que protege as células contra apoptose. A sertralina atua inibindo a fosforilação de Akt e induzindo a morte celular por estresse de retículo em modelo animal (Reddy *et al.*, 2008). Uma revisão recente explorou o mecanismo secundário dos SSRIs por seu efeito oncolítico, e também indicou sua ação inibitória em bombas de multirresistência, aumentando a eficácia das quimioterapias. Entretanto, o efeito citotóxico dos SSRIs é alcançado com a concentração do fármaco no espectro micromolar, uma concentração consideravelmente superior à dos pacientes que usam os medicamentos para tratamento psiquiátrico. Portanto, há uma preocupação com os efeitos colaterais que os pacientes podem sofrer com a superdosagem desses medicamentos. Morch e colaboradores (2017) avaliaram associações entre vários antidepressivos e risco de câncer epitelial de ovário em mulheres com idade entre 30-84 anos durante 2000-2011. Eles descobriram que o uso de inibidores seletivos de recaptção de serotonina foi associado a uma redução do risco de câncer de epitelial de ovário; implicando assim propriedades quimiopreventivas potenciais destas drogas (Morch *et al.*, 2017). Assim, vale a pena considerar o uso de SSRIs em combinação com as quimioterapias atuais.



Amit e colaboradores (2009) demonstraram que a sertralina aumentou significativamente a sensibilidade das células Jurkat (linfoma / leucemia) aos agentes quimioterápicos vincristina e doxorrubicina (Amit *et al.*, 2009). Drinberg e colaboradores (2014) utilizaram a nanodrofinas DOXIL que facilita o influxo de quimioterapia em células de câncer de ovário juntamente com a sertralina, essa combinação diminuiu o efluxo quimioterápico da célula. Dessa forma a sertralina tem a capacidade de reverter a resistência a múltiplas drogas causada por bombas de glicoproteína-P (Drinberg *et al.*, 2014). Lin e colaboradores (2016) mostraram que a adição de fluoxetina promoveu inibição do crescimento de interferon-alfa (IFN- $\alpha$ ) em células de carcinoma de bexiga humano, mas não em células uroepiteliais normais (Lin *et al.*, 2016). Com isso podemos observar multiplas ações dos SSRIs na terapia contra o câncer.

Nossos resultados sugerem que os efeitos da sertralina não sejam exclusivamente dependentes da ativação de P53 e da indução da apoptose, mas sim por um mecanismo complexo que possibilita as células suprimir as características tumorais. Quando utilizamos linhagens de melanoma humano com p53 mutado (A2058), obtivemos resultados de efeitos antitumorais muito semelhantes ao das células com p53 selvagem (MeWo) (Figuras 1 e 2 do artigo e Figuras 9 e 10). A linhagem B16F10, melanoma murino, bem como a linhagem de melanoma humano A2058 (V247F) apresentam mutações no gene que codifica a proteína P53 (Marone *et al.*, 2009). A linhagem MeWo foi a única linhagem estudada na qual o gene p53 não apresentava mutações (Soussi, 2007). O p53 é um gene comumente mutado na tumorigênese contudo, no caso dos melanomas, a grande maioria dos tumores apresenta p53 selvagem (sem mutações). Este gene atua como um ativador transcricional com diversos genes como alvo, incluindo reguladores da estabilidade do genoma, da resposta celular ao dano do DNA e da progressão do ciclo celular. A introdução de p53 selvagem em linhagens celulares que perderam a função endógena de p53 pode gerar parada no ciclo ou induzir apoptose (Amson *et al.*, 2012). No caso dos melanomas a reativação de p53 pode ser uma estratégia terapêutica efetiva (Marone *et al.*, 2009). p53 é um regulador chave da apoptose e supressor tumoral que pode reestabelecer o fenótipo normal ou induzir a morte de células tumorais (Kasthuber e Lowe, 2017). A redução da TCTP, proteína

multifuncional com diversos parceiros moleculares e envolvida em diversas vias celulares importantes, influencia moléculas como a P53, levando a uma complexa alteração do comportamento celular e, provavelmente, à reversão tumoral. Entretanto, o mecanismo específico e detalhado das consequências da inibição da TCTP ainda precisa ser elucidado.

Dessa forma é importante destacar a TCTP como uma proteína alvo no tratamento do melanoma e marcador molecular, além da sertralina como droga que pode ser utilizada na terapia multimodal do melanoma. A diminuição dos níveis da TCTP durante o tratamento e a manutenção de níveis inferiores após a exposição resultaram na perda de características tumorais, tais como migração, proliferação, clonogenicidade e crescimento tumoral, em um contexto que sugere envolvimento de reprogramação celular e de reversão tumoral.

## 2. CAPÍTULO-2 LiTCTP COMO UM FATOR DE LIBERAÇÃO DE HISTAMINA

### 2.1 INTRODUÇÃO

Estudos recentes na área de toxinologia têm identificado e caracterizado diversas moléculas com potencial biotecnológico em inúmeras áreas. A produção de proteínas recombinantes do veneno da aranha-marrom tornou-se uma alternativa científica bastante útil para caracterização e estudo dos componentes do veneno (Senff-Ribeiro *et al.*, 2008).

Diferentes toxinas do veneno de aranhas do *Loxosceles* já foram identificadas como a fosfolipases-D, hialuronidases, metaloproteases e serino-proteases (Senff-Ribeiro *et al.*, 2008; Gremski *et al.*, 2010; Chaim *et al.*, 2011). Dentre esses componentes do veneno, foi identificada uma proteína da superfamília da TCTP (*Translationally Controlled Tumor Protein*), denominada LiTCTP (Gremski *et al.*, 2010; Sade *et al.*, 2012). Dados do transcriptoma da glândula de veneno de *Loxosceles intermedia* mostram que 0,4% dos transcritos relacionados correspondem a sequencias codificantes da TCTP (Gremski *et al.*, 2010).

Estudos demonstraram que a TCTP produzida por outras espécies, em meio extracelular, é capaz de gerar a degranulação mastócitos provocando a liberação de histamina, normalmente em pacientes parasitados ou com alergia (Gachet *et al.*, 1999; Bommer e Thiele, 2004). Esta liberação de histamina pode ser dependente ou independente de IgE, porém se acredita que possa existir a participação de um receptor específico de TCTP que leva à ativação dos mastócitos. Apesar de ser encontrada em fluídos biológicos de pacientes asmáticos ou parasitados e na saliva de carrapatos, o mRNA que codifica a proteína não codifica um peptídeo sinal de secreção, e até o momento nenhuma proteína precursora foi descrita. Resultados sugerem que a TCTP seja secretada via exossomos, uma via não clássica de secreção (Bheekha-Escura *et al.*, 2000; Hinojosa-Moya *et al.*, 2008; Lespagnol *et al.*, 2008).

Além de ser encontrada em pacientes com alergia, a proteína TCTP com atividade liberadora de histamina é secretada por diversos nematódeos no

organismo hospedeiro, induzindo eosinofilia e liberação de histamina a partir de basófilos. Estes dados sugerem que a TCTP está envolvida com a resposta inflamatória em indivíduos parasitados (Rao *et al.*, 2002; Gnanasekar *et al.*, 2009).

No veneno de *Loxosceles intermedia*, a TCTP atua de forma rápida no início do processo inflamatório. Quando inoculada em camundongos altera a permeabilidade capilar, aumentando o extravasamento do líquido intersticial e causando edema. Além disso, anticorpos policlonais produzidos a partir da TCTP recombinante de *L. intermedia* (LiRecTCTP) detectaram TCTPs nativas presentes em linhagens celulares normais e tumorais (RAEC, B16-F10 e HL-60). Estes dados estão de acordo com os dados da literatura que apontam uma alta conservação biológica das TCTPs. Quando analisada a sequência aminoacídica da LiTCTP, esta apresentou alto grau de identidade com proteínas TCTP de carrapatos (Sade *et al.*, 2012). Esta proteína foi identificada na saliva do carrapato *Dermacentor variabilis* e apresentou atividade de liberação de histamina em linhagem celular basofílica RBL-2H3, utilizadas como modelo de estudo de vias de sinalização em mastócitos (Mulenga *et al.*, 2003).

Rattmann e colaboradores (2008) demonstraram que o veneno de *L. intermedia* apresenta efeitos dependentes de mastócitos e de histamina. Eventos iniciais da inflamação, como o aumento da permeabilidade vascular, foram relacionados com a participação de receptores histaminérgicos e serotoninérgicos. Experimentos com aorta de coelho mostraram que o veneno de aranha-marrom é capaz de causar a liberação regulada de mediadores dos mastócitos, principalmente a histamina, responsável por induzir a vasodilatação. Posteriormente, Paludo e colaboradores (2009) identificaram a presença de histamina no veneno em quantidades suficientes para exercer efeitos inflamatórios. Apesar disso, o veneno dialisado, sem a presença de histamina, ainda era capaz de exercer certo efeito inflamatório dependente de histamina, decorrente de algum outro componente presente no veneno agindo diretamente sobre os mastócitos (Rattmann *et al.*, 2008; Paludo *et al.*, 2009).

Dessa forma é de interesse estudar a TCTP de *L. intermedia* a fim de entender melhor o seu papel no loxoscelismo, validá-la como um possível fator

de liberação de histamina em mastócitos e utilizá-la como bioferramenta para o estudo do processo inflamatório e alérgico.

## 2.2 OBJETIVOS

### 2.2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliação biológica da proteína da família TCTP (LiRecTCTP) obtida a partir de biblioteca de cDNA da glândula de veneno de aranha-marrom (*Loxosceles intermedia*) como um fator liberador de histamina.

### 2.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Purificar a toxina LiRecTCTP;
- Avaliar as estruturas secundárias da toxina recombinante;
- Avaliar a viabilidade e alterações morfológicas das células RBL-2H3 após exposição a LiRecTCTP;
- Estudar os efeitos da LiRecTCTP sobre as células RBL-2H3, avaliando a degranulação e influxo de cálcio na presença e ausência de inibidor de degranulação;
- Avaliar a expressão de mediadores inflamatórios em células RBL-2H3 após exposição à LiRecTCTP.
- Avaliar a atividade *in vivo* da LiRecTCTP, buscando entender seu mecanismo de ação;

- Avaliar o papel da LiRecTCTP em ensaios *in vivo* de dermonecrose e de aumento da permeabilidade causada pelo envenenamento loxoscélico.

## 2.3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.3.1 Fator de Liberação de Histamina

Em 1995, o grupo de MacDonald descreveu a TCTP como uma molécula que possui a capacidade de liberar histamina de basófilos e a chamou de fator de liberação de histamina (HRF, *histamine releasing factor*) (Macdonald *et al.*, 1995; Macdonald, 2012; Amson, Karp, *et al.*, 2013). A atividade de liberação de histamina foi demonstrada pela primeira vez em 1979 utilizando células mononucleares de sangue periférico (PBMC). Os sobrenadantes de culturas de PBMC foram capazes de induzir a liberação de histamina em basófilos. A atividade de liberação de histamina também pode ser estimulada por concanavalina A, estreptoquinase/ estreptodornase (SK/SD) e *Candida albicans*. Inicialmente, tentou-se caracterizar a TCTP/HRF como uma nova citocina, um fator de liberação de histamina (HRF), que é capaz de induzir a liberação de histamina de basófilos humanos. MacDonald e colaboradores encontraram homologia entre a TCTP/HRF e a proteína humana, p23 e seu homólogo em camundongo, p21, ambos associados ao crescimento tumoral (Kim *et al.*, 2012).

Como discutido no Capítulo I, a TCTP/HRF é altamente conservada entre os organismos e apresenta proteínas homólogas em diversos tecidos e células (Macdonald *et al.*, 1995). Aproximadamente 50% de todos seus resíduos de aminoácidos são conservados. As TCTPs de eucariotos possuem alto grau de identidade e são totalmente conservadas em espécies do mesmo gênero (Thayanithy, 2005; Hinojosa-Moya *et al.*, 2008).

Proteínas da superfamília TCTP têm sido encontradas em secreções glandulares de artrópodes, como carrapatos (do gênero *Ixodis*), e na glândula de veneno de aranha lobo (*Lycosa godeffroyi*), onde foi descrita como a principal toxina farmacológica (Mulenga e Azad, 2005; Rattmann *et al.*, 2008; Gremski *et al.*, 2014). Os membros da família TCTP presentes em secreções são também descritos como HRFs extracelulares e estão associados a reações alérgicas geradas por parasitas. Parasitas como *Schistosoma mansoni*, *Brugia malayi* e *Wuchereria bancrofti* possuem a capacidade de secretar a proteína TCTP no organismo hospedeiro (Rao *et al.*, 2002; Gnanasekar *et al.*, 2009).



Além destes, o *Plasmodium falciparum*, causador da malária, também secreta TCTP no organismo hospedeiro e a TCTP recombinante de *P. falciparum* é capaz de causar a liberação de histamina de basófilos e de IL-8 de eosinófilos. Acredita-se que a TCTP possa ter um papel na proliferação celular do *P. falciparum*, bem como sua capacidade de liberar histamina possa auxiliar o parasita na dispersão pelo organismo hospedeiro. Sabe-se que a droga artemisinina, utilizada para o tratamento da malária, liga-se diretamente à proteína TCTP e que cepas resistentes à droga apresentam maior expressão desta proteína (Walker *et al.*, 2000; Macdonald *et al.*, 2001).

Em artrópodes, a proteína TCTP já foi descrita em 63 espécies. O maior número de proteínas descritas está na classe dos insetos, sendo que apenas na família *Drosophilidae* já foram encontradas 14 proteínas da família TCTP. Na classe dos aracnídeos foram descritas 10 proteínas TCTP, sendo 8 de carrapatos e apenas três em aranhas, uma delas da aranha *Lycosa singoriensis* e as outras na aranha-marrom *Loxosceles laeta*, *Loxosceles gaucho* e *Loxosceles intermedia* (Mulenga *et al.*, 2003; Mulenga e Azad, 2005; Sade *et al.*, 2012). Mulenga e colaboradores (2003) demonstraram que a proteína TCTP é expressa em diversos tecidos do carrapato *Dermacentor variabilis*, inclusive na glândula salivar. A partir da biblioteca de cDNA desta glândula, uma proteína TCTP recombinante foi clonada, expressa e se mostrou capaz de liberar histamina a partir da linhagem celular basofílica RBL-2H3. A saliva do carrapato, na qual foi demonstrada a presença da proteína TCTP, também apresentou atividade de liberação de histamina. Posteriormente, o mesmo grupo de pesquisadores mostrou que outros três carrapatos (*Dermacentor andersoni*, *Boophilus microplus* e *Amblyomma americanum*) também expressam a proteína TCTP, todas com alto grau de similaridade com a TCTP de *D. variabilis* (Mulenga *et al.*, 2003; Mulenga e Azad, 2005; Sade *et al.*, 2012). Uma TCTP com atividade liberadora de histamina também foi identificada no carrapato de galinhas *Dermanyssus gallinae* e foi utilizada como imunógeno no estudo de uma potencial vacina (Bartley *et al.*, 2009).

Em carrapatos, a função de liberação de histamina da proteína TCTP pode estar envolvida com a alimentação, aumentando a vasodilatação e facilitando a ingestão de sangue do animal, mas esta hipótese não é um consenso (Bartley *et al.*, 2009). Com base nos dados de que a proteína TCTP

de diversos parasitas é secretada no organismo hospedeiro fundamenta-se a hipótese de que ela possa estar envolvida em processos patológicos da resposta do hospedeiro e na resistência dos parasitas a drogas. O alto grau de conservação da proteína desde eucariotos unicelulares até plantas e animais sugere que a atividade de citocina foi adquirida tardiamente na história evolutiva da proteína (Bommer e Thiele, 2004).

A estrutura primária da TCTP/ HRF humana consiste em aproximadamente 170 aminoácidos e sua estrutura terciária contem três domínios, um domínio  $\beta$ , uma  $\alpha$ -hélice e um loop flexível. Apesar da TCTP/ HRF não possuir um sinal de secreção na sua estrutura primária, ela pode ser exportada para fora da célula (Susini *et al.*, 2008). Já foi descrito que a TCTP pode ser enviada para o meio extracelular através de uma via não clássica, a via dos exossomos (Lespagnol *et al.*, 2008). Além disso a TCTP possui em sua estrutura um domínio para internalização celular (PTD) na região N- terminal e uma região de ligação ao cálcio na região de hélice. Na região do core ( $\beta$ -*stranded*) encontramos resíduos conservados, demonstrando sua importância em interações moleculares (Kim *et al.*, 2012). Além disso, os cristais da TCTP humana obtidos por cristalografia mostram três regiões  $\alpha$ -hélice e nove regiões de folhas- $\beta$  (Susini *et al.*, 2008).

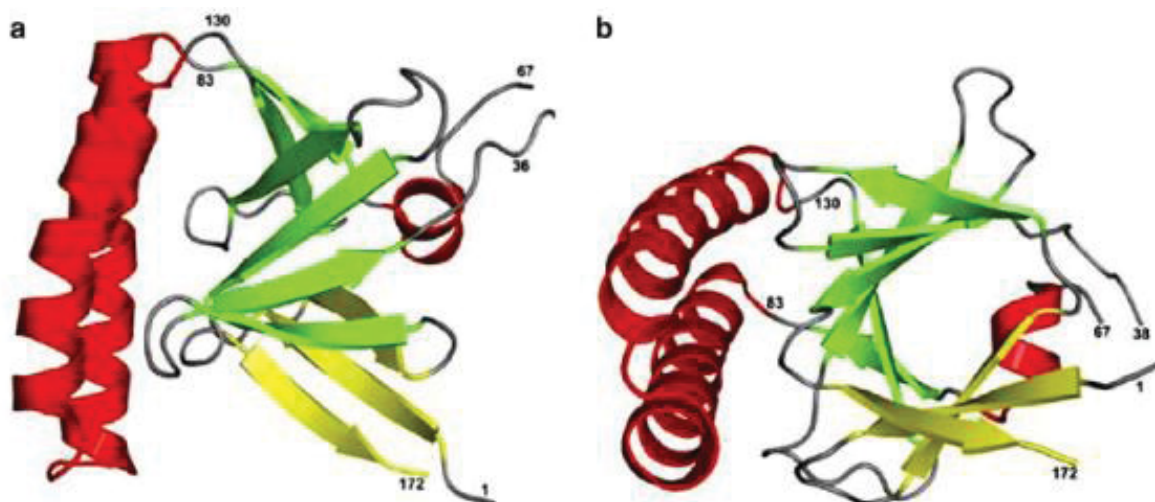


Figura 13: **Estrutura do Cristal da Proteína TCTP.** Duas orientações diferentes da molécula (a e b) mostrando folhas- $\beta$  distorcidas em verde e amarelo e três  $\alpha$ -hélices em vermelho. Adaptado de: Susini *et al.*, 2008.

A TCTP/ HRF induz a liberação de histamina e de interleucinas (IL-4 e IL-3) de basófilos (Schroeder *et al.*, 1996; 1997). A TCTP/HRF pertence a uma

heterogênea família de fatores que estimulam a secreção de histamina por diferentes mecanismos. Esses processos foram divididos em dois grupos: dependentes de IgE e independentes de IgE. Os dependentes de IgE podem ou não interagir diretamente com IgE. Alguns estudos demonstraram que a TCTP é uma proteína que atua liberando histamina de forma dependente do receptor de IgE porém, ela não interage diretamente com o receptor de IgE. Entretanto, os níveis de histamina liberados, gerados independentemente de IgE, estão correlacionados com o estado alérgico do doador, enquanto aqueles gerados de forma dependente de IgE estão relacionados com o estado clínico do paciente com reações de alergia crônica, como asma e rinite. Atualmente, ainda existe a hipótese de que a proteína TCTP possua seu próprio receptor em basófilos, o que ainda não foi demonstrado (Macdonald *et al.*, 1995; Macdonald, 1997; Wantke *et al.*, 1999; Vonakis *et al.*, 2008; Macdonald, 2012).

Até os dias de hoje, o mecanismo pelo qual a TCTP/HRF induz a liberação de histamina é pouco conhecido. Análises de citometria de fluxo revelaram que a proteína liga-se à superfície de basófilos humanos de doadores responsivos ou não à TCTP/HRF. O tratamento de basófilos com TCTP inicia um processo de sinalização semelhante ao mediado por IgE, pela ativação da enzima Syk quinase, com fosforilação de MEK e ERK, entretanto sem a fosforilação do receptor de IgE e por uma via diferente da que é induzida por IL-3. A degranulação de basófilos em resposta à proteína TCTP depende ainda de PIP3, ativação de PI3K e Akt (Vonakis *et al.*, 2008; Macdonald, 2012).

A TCTP pode ativar eosinófilos humanos levando à produção de IL-8 por essas células e induzir a resposta de cálcio intracelular (Bheekha-Escura *et al.*, 2000). A atividade de TCTP é semelhante à de uma citocina, sendo necessária sua dimerização via pontes dissulfeto na região N-terminal da proteína (Bheekha-Escura *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2011). Kang e colaboradores (2001) demonstraram que a TCTP/HRF se liga a células B e induz a produção de citocinas (IL-1 e IL-6) e identificou que a TCTP é um fator de crescimento de células B (Kang *et al.*, 2001).

Estudos recentes mostraram que a TCTP/HRF pode estimular células epiteliais bronquiais a produzir IL-8 e que ela é um fator de estimulação de colonização de macrófagos/ granulócitos. TCTP é expressa no timo e, neste

órgão, é um fator crucial para manutenção das células T periféricas e proliferação celular. Portanto, além da função de fator de liberação de histamina, estudos demonstraram que a TCTP pode modular a secreção de citocinas de basófilos, eosinófilos, células B, células T e células epiteliais bronquiais humanas (Yoneda *et al.*, 2004). Células tumorais apresentam vários mecanismos para burlar do sistema imune. Dessa forma o processo inflamatório tem sido relacionado ao desenvolvimento do câncer. Assim, o papel da TCTP no sistema imune e no desenvolvimento de tumores sugere que a TCTP pode ser o alvo ideal para supressão na tumorigênese (Macdonald, 2012; Acunzo *et al.*, 2014).

### 2.3.2 TCTP de *Loxosceles intermedia*

A proteína TCTP foi identificada na biblioteca de cDNA da glândula de veneno de aranha-marrom *Loxosceles intermedia*. A proteína TCTP de *L. intermedia* apresenta um alto grau de semelhança com as TCTPs de carrapatos já descritas como fatores de liberação de histamina (Bartley *et al.*, 2009; Sade *et al.*, 2012). Em trabalho anterior, o nosso grupo realizou a clonagem e expressão heteróloga da TCTP de *L. intermedia*, obtendo uma proteína recombinante denominada LiRecTCTP, a qual foi purificada em dois passos de cromatografia. Sade e colaboradores (2012) demonstraram que a TCTP de *L. intermedia* está presente no processo inflamatório decorrente do loxoscelismo. Realizando ensaios *in vivo*, foi possível observar que a LiRecTCTP causa aumento da permeabilidade vascular e edema em camundongos. A TCTP de *L. intermedia* pode ser o primeiro e mais rápido componente na formação do edema no loxoscelismo (Sade *et al.*, 2012).

O transcriptoma da glândula de veneno da aranha-marrom *Loxosceles intermedia* identificou 0,4% do total de transcritos referentes a proteína TCTP (Gremski *et al.*, 2010). A proteína recombinante LiRecTCTP e a proteína nativa TCTP presente no veneno apresentam reatividade imunológica cruzada em ensaios de imunodeteção (Sade *et al.*, 2012). Além disso, identificamos proteínas correlatas à TCTP nos venenos de *L. gaucho* e *L. laeta* pela

detecção de epítomos conservados relacionados à LiTCTP nesses venenos (Buch *et al.*, 2015).

### 2.3.3 Loxoscelismo

Loxoscelismo é o quadro clínico desenvolvido pelo envenenamento por aranhas do gênero *Loxosceles*, e se manifesta em sintomas cutâneos e/ou sistêmicos. O quadro cutâneo é o mais comum e pode levar ao desenvolvimento de uma lesão necrótica com espalhamento gravitacional, resultado de uma inflamação exacerbada que envolve a participação de mastócitos e eventos histaminérgicos. Os principais sintomas do quadro sistêmico envolvem distúrbios hemolíticos, lesão renal, coagulação intravascular disseminada, hemólise intravascular, aumento da bilirrubina indireta, icterícia e trombocitopenia, sendo esse quadro responsável pelo maior número de mortes relacionadas ao loxoscelismo (Da Silva *et al.*, 2004; Chaim *et al.*, 2006; Gremski *et al.*, 2014).

O veneno de *Loxosceles intermedia* é composto por diversas toxinas, enriquecido em proteínas que variam de 3 a 40 kDa. Os mecanismos pelos quais o veneno exerce seus efeitos ainda não são totalmente conhecidos. Acredita-se que esse efeito seja resultado do sinergismo entre os componentes do veneno (Da Silva *et al.*, 2004; Appel *et al.*, 2008; Gremski *et al.*, 2014). Alguns constituintes do veneno já foram identificados como a fosfolipase-D, hialuronidase, metaloprotease e serino-proteases (Senff-Ribeiro *et al.*, 2008; Gremski *et al.*, 2010; Gremski *et al.*, 2014). Dentre os componentes do veneno, está presente uma proteína da família TCTP (*Translationally Controlled Tumor Protein*).

Em alguns casos, o envenenamento por aranhas do gênero *Loxosceles* pode causar hipersensibilidade e reações alérgicas. Os sintomas cutâneos gerados pelo envenenamento incluem eritema, edema, coceira e dor. Muitos sintomas observados durante o loxoscelismo podem ser mimetizados pelas toxinas fosfolipase-D, sendo esse o grupo de toxinas mais caracterizado e estudados nos venenos de aranhas do gênero *Loxosceles*. Porém as fosfolipases recombinantes não são capazes de induzir o edema de pata com a mesma intensidade que o veneno. A maior formação de edema durante o

envenenamento pode estar associada a eventos histaminérgicos, como aumento da permeabilidade vascular e vasodilatação. Sugere-se que a LiTCTP possa estar relacionada a esses efeitos do veneno (Sade *et al.*, 2012; Gremski *et al.*, 2014).

Até o momento não foi descrita uma toxina que cause a liberação direta de histamina. Entretanto, dados da literatura sugerem a presença de componentes termolábeis envolvidos com a sinalização mediante receptores histamínicos, promovendo a liberação de histamina a partir de mastócitos. A caracterização desses componentes pode representar um avanço no tratamento inicial de acidentes envolvendo as aranhas-marrom (Paludo *et al.*, 2009).

Além disso, Rattmann e colaboradores (2008) demonstraram que o veneno de *L. intermedia* apresenta efeitos dependentes de mastócitos e de histamina. Eventos iniciais da inflamação, como o aumento da permeabilidade vascular, foram relacionados com a participação de receptores histaminérgicos e serotoninérgicos. Experimentos com aorta de ratos, em câmara para órgão isolado, mostraram que o veneno de aranha-marrom é capaz de causar a liberação regulada de mediadores dos mastócitos, principalmente a histamina, responsável por induzir a vasodilatação. Posteriormente, Paludo e colaboradores (2009) identificaram a presença de histamina no veneno em quantidades suficientes para exercer efeitos inflamatórios. Apesar disso, o veneno dialisado, sem a presença de histamina, ainda era capaz de exercer certo efeito inflamatório dependente de histamina, decorrente de algum outro componente presente no veneno, agindo diretamente sobre os mastócitos (Rattmann *et al.*, 2008; Paludo *et al.*, 2009).



## 2.4 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.4.1 Reagentes

Os sais, compostos orgânicos, ácidos e solventes orgânicos utilizados no trabalho foram adquiridos da Merck (Darmstad, Alemanha). Da Sigma (st. Louis, EUA) foram adquiridos o  $\beta$ -mercaptoetanol, marcadores de massa molecular utilizados nos géis de poliacrilamida, MTT, o p-nitrofenil n-acetil-beta-D-glucosamina, ácido plurônico, os inibidores (cromoglicato de sódio, prometazina, cimetidina e tioperamida). Da Gibco (Bethesda, EUA) foram adquiridos Glicina, Tris, Acrilamida e Bisacrilamida (para preparo da solução de poliacrilamida), TEMED e Dodecil Sulfato de Sódio (SDS), além dos meios para cultivo celular e soro fetal bovino. O corante Azul de Coomassie Brilhante R-250 foi adquirido da Amresco (Solon, EUA). Para quantificação de proteínas, foi adquirido da Bio- Rad (Hercules, EUA) o reativo Dye Reagent Concentrate. Da empresa Fermentas (Burlington, Canadá) foram adquiridos os reagentes para biologia molecular: marcadores de massa molecular, dNTPs e o IPTG. Os oligonucleotídeos utilizados nas reações de qPCR foram produzidos sob encomenda pela Exxtend (Campinas, Brasil). Para o cultivo de bactérias foram utilizados no preparo dos meios de Triptona, Extrato de Levedura e ágar-ágar adquiridos da Himedia (Mumbai, Índia). Os antibióticos Ampicilina e Cloranfenicol foram adquiridos da USB (Cleveland, EUA). A resina Ni<sup>2+</sup>-NTA agarose foram adquiridas da invitrogen (Carlsbad, EUA). Da ThermoScientific (Waltham, USA) foram obtidos o reativo de Trizol® e o kit Power Sybr® Green RNA-to-ct 1-Step Kit, fluo-4AM.

### 2.4.2 Extração do veneno por Eletrochoque

O veneno foi obtido através de eletrochoque de 15 V no cefalotórax de aranhas *Loxosceles intermedia*. Após a coleta o *pool* do veneno foi diluído em tampão PBS para uma concentração de 2 mg/mL e congelado a -20 °C até o uso (Feitosa *et al.*, 1998).

### 2.4.3 Expressão da Proteína Recombinante LiRecTCTP

A proteína LiRecTCTP foi expressa como uma proteína de fusão, contendo um His-tag N-terminal para possibilitar sua purificação. As construções foram transformadas em cepas bacterianas de expressão *E.Coli* BL21(DE3) pLysS quimiocompetentes e as bactérias plaqueadas em meio LB ágar contendo ampicilina (100 µg/ml) e cloranfenicol (34 µg/ml). Para expressão uma colônia isolada foi inoculada em 10 mL de meio LB contendo ampicilina e cloranfenicol incubada a 37°C durante 16h. Esta cultura foi inoculada na diluição 1:100 em 1L de meio LB com os antibióticos, e o crescimento monitorado pela determinação da densidade óptica em 550 nm. Quando a cultura atingiu a DO (550nm) entre 0,4 e 0,6 foi adicionado o indutor IPTG em concentração de 0,1mM e a cultura foi incubada por 4 horas a 23°C uma alíquota antes da indução, e uma alíquota após 4 horas de expressão foram coletadas. As amostras foram analisadas por eletroforese em gel SDS-PAGE 12,5% em condições redutoras (5% de β-mercaptoetanol). A cultura foi centrifugada (9000 x g, 9 minutos) e ressuspensa em 20 ml de tampão de ligação nativo (fosfato disódico 18,3 mM, fosfato monosódico 1,7 mM, NaCl 500 mM, 10 mM de imidazol e pH= 8.0). A suspensão bacteriana foi congelada a -80 °C por 16h.

### 2.4.4 Purificação da Proteína LiRecTCTP

A purificação da proteína recombinante foi realizada por cromatografia de afinidade em resina Ni<sup>2+</sup>-NTA Agarose em condições nativas. A suspensão de células foi descongelada e lisada por 8 ciclos de 30s de sonicação em alta intensidade. O lisado foi centrifugado (9000 x g, 30 minutos) e o sobrenadante incubado por 60 min a 4°C com 1 mL de resina em agitação moderada. A suspensão foi empacotada em coluna plástica e lavada exaustivamente com o tampão de lavagem (fosfato sódico 20 mM pH 8.0, NaCl 500 mM, imidazol 35 mM) sendo a D.O. 280 nm monitorada durante todo o procedimento de

purificação. A proteína foi eluída quando a DO (280 nm) atingiu valor inferior ou igual a 0,001, utilizando-se tampão de eluição (fosfato sódico 50 mM pH 8,0, NaCl 500 mM, imidazol 350 mM). O eluato foi analisado por eletroforese em gel SDS-PAGE 12,5% sob condições redutoras e a proteína obtida dialisada contra PBS pH 7,2.

#### 2.4.5 Dosagem de Proteínas pelo Método de Bradford

A dosagem de proteínas foi realizada pelo método de azul de Coomassie, descrito por Bradford (1976), adaptado para leitura em leitor de placas de 96 wells (Meridian ELX 800). A curva padrão foi construída com diferentes massas (0,25 µg – 2,00 µg) de albumina soro bovina e as amostras foram diluídas para entrarem na região de linearidade da curva. A leitura foi realizada em espectrofotômetro Meridian ELX800 no comprimento de onda de 595 nm.

#### 2.4.6 Eletroforese de Proteína em Gel de Poliacrilamida

As eletroforeses foram realizadas em géis de poliacrilamida (SDS-PAGE) com concentração de 12,5% em condições redutoras. Os géis foram preparados utilizando o aparato comercial mini-protean 3 (Bio-rad, Hercules, EUA). A separação das proteínas ocorreu a partir da aplicação de corrente de 25 mA constante. Os géis foram corados em solução contendo azul de Coomassie brilhante r-250 (Amresco, Ohio, EUA) 0,25%, metanol 50% e ácido acético 10% em água deionizada, durante 10 minutos à temperatura ambiente sob agitação constante. A descoloração foi realizada com metanol 50% em água deionizada, com sucessivas trocas da solução de metanol (Wright, 1989).

#### 2.4.7 Dicroísmo Circular

Para o dicroísmo circular LiRecTCTP foi dialisada a 4°C contra tampão fosfato (20 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$  pH 7.4) para a concentração de 0,5 mg/mL. O espectro foi obtido em intervalos de 0,5 nm/min utilizando o tempo de resposta de 8s e a largura da banda de 1 nm. A temperatura foi mantida constante em 20°C (vuitica et al., 2016). As medidas foram realizadas em triplicata. Os resultados são fornecidos em milidegree (MRE) e são convertidos para elipticidade molar (MRW) utilizando a seguinte fórmula:  $(\text{MRE}) = (\text{MRW abs}) / 10 [\text{g/L}] \text{ L}$ , onde MRW é a massa molecular dividida pelo número de resíduos de aminoácidos. A estrutura secundária do espectro foi estimada usando K2D3 Web Server.

#### 2.4.8 Cultivo Celular

As células da linhagem RBL-2H3 (células de leucemia basofílica de ratos) foram cultivadas em meio Dulbecco's Minimum Essential Medium (DMEM, Gibco) contendo antibiótico penicilina e estreptomicina (10000U/mL e 10000  $\mu\text{g/mL}$ ) e suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (GIBCO, Invitrogen). A cultura foi mantida em uma incubadora com atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$  e temperatura de 37°C.

#### 2.4.9 Ensaio de Viabilidade Celular

Para o ensaio de viabilidade por MTT foram plaqueadas  $5 \times 10^4$  células em placas de 96 poços em meio DMEM contendo 10% de SFB. Após 16 horas, as células foram lavadas com tampão Tyreodes (TGB- 137mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1mM  $\text{MgCl}_2$ , 1,8mM  $\text{CaCl}_2$ , 0,2mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 5,5 mM Glucose, 10 mM HEPES e 0,1 % BSA) e, então, tratadas com a proteína LiRecTCTP (10, 50 e 100  $\mu\text{g/mL}$ ), veneno total (10, 50 e 100  $\mu\text{g/mL}$ ), o composto 48/80 (controle positivo) (100  $\mu\text{g/mL}$ ), PBS e a toxina LiRecDT1H12A (controle negativo) (100  $\mu\text{g/mL}$ ) por 2 horas. Após o tratamento o meio foi aspirado e foi adicionado às

células 100  $\mu$ L de uma solução 0,5 mg/mL (50  $\mu$ g) de MTT (Sigma, St. Louis, USA) em PBS. As células foram incubadas em estufa com 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C durante 3 horas. O meio contendo MTT foi cuidadosamente retirado e 100  $\mu$ L de DMSO (SIGMA, St. Louis, USA) foram adicionados em cada poço. A reação foi medida em espectrofotômetro em 550 nm.

#### 2.4.10 Microscopia Eletrônica de Varredura

As células RBL-2H3 foram expostas ao PBS (controle negativo) e a LiRecTCTP (100 e 200  $\mu$ g/mL) em tampão TGB por duas horas. As células foram então lavadas com TGB e fixadas com Karnovsky (paraformaldeído 2%, glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato e sódio 0,1M pH 7.2 a 4°C) (Karnovsky, 1965). O material foi então desidratado em série alcoólica crescente e acetona, sendo o ponto crítico realizado em um Bal-Tec CPD – 030 com gás carbônico. Em seguida foi realizada a metalização em ouro obtida em um Balzers SCD – 030. As análises e a documentação do material foram feitas no microscópio eletrônico de varredura JEOL-JSM 6360 LV do Centro de Microscopia Eletrônica – Universidade Federal do Paraná.

#### 2.4.11 Dosagem de $\beta$ -hexosamina

A degranulação da linhagem RBL-2H3 foi determinada pela medida da atividade da enzima  $\beta$ -hexosaminidase. Células RBL-2H3 ( $5 \times 10^4$  células/poço) foram plaqueadas em placas de 96 poços. Após 16 horas, as células foram lavadas com TGB e tratadas com a proteína LiRecTCTP (10, 50 e 100  $\mu$ g/mL) na ausência e presença do inibidor de degranulação (Cromoglicato de Sódio-10  $\mu$ M), veneno total (10, 50 e 100  $\mu$ g/mL), o composto 48/80 (100  $\mu$ g/ml), PBS, e a toxina LiRecDT1H12A (100  $\mu$ g/mL) por 2 horas. Após o tempo de tratamento, o sobrenadante foi isolado e as células aderidas lisadas com Triton X-100 1% para obtenção do lisado. Foram incubados volumes iguais do substrato 1 mM p-nitrofenil n-acetil-beta-d glucosamina (Sigma, St. Louis, USA) em 0,05M de tampão citrato (pH 4,5) e do sobrenadante e lisado por 30

minutos a 37°C. A reação enzimática foi interrompida com adição de glicina 0,2M (pH 10) e o produto da reação foi mensurado em 450nm. O cálculo da porcentagem de atividade da enzima foi realizado baseando-se no total de enzima seguindo a fórmula (Hirano *et al.*, 2018):

$$\% \text{ da atividade } \beta\text{-hexosaminidase liberada} = \frac{\text{Leitura do sobrenadante} \times 100}{\text{Atividade total (Sobrenadante + lisado)}}$$

#### 2.4.12 Ensaio de Influxo de Cálcio

Células RBL-2H3 foram soltas e lavadas com PBS. Para internalização da sonda fluorescente as células foram incubadas por 30 min com fluo-4AM (5 mM) em tampão contendo ácido plurônico (0,01%) a 37°C. As células foram então lavadas duas vezes com PBS e incubadas por 30 min a temperatura ambiente para desesterificação. Em seguida  $5 \times 10^5$  células/ poço foram incubadas em placas pretas de 96 poços com PBS (controle negativo), LiRecTCTP (50 e 100 µg/mL) e LiRecTCTP (100 µg/mL) combinada ao Cromoglicato de Sódio (20 µM) por 5, 15, 30 e 60 min. As células foram excitadas em 485 nm e a emissão da fluorescência medida em 535 nm em Tecan Infinite M200.

#### 2.4.13 Extração RNA

A extração do RNA foi baseada no método de Trizol® (Chomczynski, 1993). Aproximadamente  $10^6$  células foram homogeneizadas com homogeinizador de tecidos (Tecnal, São Paulo, Brasil) após a adição de 300 µL de Trizol®. Após 5 min em temperatura ambiente, foram adicionados 200 µL de clorofórmio e os microtubos foram vigorosamente agitados por 15 segundos e centrifugados a 20.000 xg por 30 min a 4°C. Após a centrifugação, três fases foram obtidas: a fase aquosa contendo RNA, uma fase proteica e a fase



orgânica contendo DNA genômico. A fase aquosa foi retirada cuidadosamente e foram adicionados 150 µL de isopropanol. Os tubos foram mantidos em temperatura ambiente por 10 min para precipitação do RNA. Então, os tubos foram centrifugados (20.000 xg, 30 min, 4°C), o sobrenadante foi descartado e 300 µl de etanol 75% foi adicionado para lavar o *pellet* de RNA, procedendo-se nova centrifugação por 5 min. Após retirada do sobrenadante, os microtubos foram abertos em fluxo laminar, imersos em gelo, até secar o pellet que, posteriormente, foi ressuspedido em 30 µL de água ultrapura tratada com DEPC (dietilpirocarbonato). O RNA foi então dosado (NanoVue, GE Healthcare, UK), analisando a razão 260/ 280nm para avaliar a relação de ácido nucléico extraído em relação as proteínas (contaminantes).

#### 2.4.14 qPCR

A análise de PCR em tempo real (qrt-PCR) foi realizada a fim de avaliar e comparar a expressão de interleucinas nas células RBL-2H3 após exposição à LiRecTCTP. Para tanto foi utilizado o kit Power Sybr® Green RNA-to-ct 1-Step Kit (Applied Biosystems). Para detectar a expressão de IL-3 foram utilizados os oligonucleotídeos IL3-f 5'-ACAATGGTTCTTGCCAGCTCTAC-3'; IL3-r 5'-AGGAGCGGGAGCAGCAT-3'. Para detectar a expressão de IL-4 foram utilizados os oligonucleotídeos IL4-f 5'-CAGGGTGCTTCGCAAATTTTAC-3'; IL4-r 5'-ACCGAGAACCCCAGACTTGTT-3'. Para detectar a expressão do gene gapdh (controle endógeno) também foram utilizados primers gapdh-f 5'-TTCACCACCATGGAGAAGGC-3'; gapdh-r 5'-GGCATGGACTGTGGTCATGA-3'. Cada PCR em tempo real foi realizado em apenas um passo, utilizando RNA equivalente a 10 ng do RNA total de acordo com as recomendações do fabricante, num volume final de 10 µL. Todas as amostras foram realizadas em triplicata e foram submetidas a 40 ciclos de amplificação em Applied Biosystems Step-one Plus Real-time PCR System. Para quantificação foi empregado o método  $\Delta\Delta C_t$ , utilizando GAPDH como padrão endógeno para cada amostra. Para os gráficos, o  $\Delta\Delta C_t$  foi normalizado para os controles e expresso em diferença de percentagem.

#### 2.4.15 Tratamento Farmacológico *in vivo*

O cromoglicato de sódio (cromolina), inibidor de degranulação em mastócitos, foi administrado por via intraperitoneal na dose de 30 mg/kg, durante 3 dias antes da LiRecTCTP. A prometazina, inibidor de receptor de histamina tipo 1 (H1R), foi administrada por via endovenosa na dose de 5 mg/kg, 30 minutos antes da LiRecTCTP. A cimetidina, inibidor de receptor de histamina tipo 2 (H2R), foi administrada por via intraperitoneal na dose de 15 mg/kg, 2 horas antes da LiRecTCTP. A tioperamida, inibidor de receptor de histamina tipo 3 e 4 (H3R e H4R), foi administrada por via intraperitoneal na dose de 20 mg/kg, 30 minutos antes da LiRecTCTP (kimura et al., 2015).

#### 2.4.16 Permeabilidade Vascular

Alterações na permeabilidade vascular foram observadas pelo extravasamento do corante azul de Evans no compartimento extracelular da pele na porção dorsal esquerda de cada camundongo (SADE et al., 2011). Para o experimento com os inibidores, os animais foram separados em grupos com 5 camundongos cada, pré-tratados com os fármacos prometazina, cimetidina (paludo et al., 2009), tioperamida e cromoglicato, de acordo com as diferentes vias e tempos específicos para cada droga, como descritos no item anterior. A diluição do corante foi feita em PBS (30 mg/Kg por camundongo), o qual foi injetado por via endovenosa (100 µl de solução). Então foram realizadas injeções intradérmicas de 100 µl da LiRecTCTP diluída em PBS (10 µg por camundongo) ou 100 µl de PBS (controle negativo). Depois de 1 hora os animais foram eutanasiados e as peles foram fotografadas (SADE et al., 2012), e removidas para quantificação do corante. Para isso foram incubadas por 72 horas a 36°C em 1 mL de formamida, a absorbância do extrato foi medida em 610 nm em leitor de placas de 96 wells (Meridian ELX 800) (PALUDO et al., 2009). Para os ensaios de avaliação sinérgica com a LiRecDT1 30 mg/Kg por camundongo de Azul de Evans foi inoculado via endovenosa (100 µl de

solução). 5 animais de cada grupo foram inoculados com PBS e GFP (controles negativos), LiRecTCTP (5 e 10 µg por camundongo), LiRecDT1 (1 µg) e as combinações LiRecTCTP 5 µg + LiRecDT1 1 µg e LiRecTCTP 10 µg + LiRecDT1 1 µg. Após 1 hora os animais foram eutanasiados e as peles fotografadas (Sade *et al.*, 2012). Os procedimentos utilizados foram aprovados pela comissão de ética de uso de animais da universidade federal do paraná (CEUA-UFPR), certificado N  730 e 1183 (anexo).

#### 2.4.17 Edema de Pata

O desenvolvimento do edema de pata foi mensurado em diferentes intervalos de tempo (Sade *et al.*, 2012). Foram separados grupos com 5 camundongos cada e o pré-tratamento realizado com as drogas farmacológicas (100 µl por diferentes vias de acordo com cada fármaco, descrito no item 9.16) ou 100 µl de PBS (controle) (Kimura *et al.*, 2015). Após os tempos pré-determinados, foi injetado na pata direita de cada camundongo 10 µg da LiRecTCTP (em 10 µl de PBS) ou 10 µl de PBS (controle negativo). A evolução do edema foi medida usando um micr metro digital calibrado (Digimess, São Paulo) nos seguintes tempos: 0, 5, 10, 20, 30, 60, 120, 240, 360, 720 e 1440 minutos imediatamente após a injeção da LiRecTCTP. Os procedimentos utilizados foram aprovados pela comissão de  tica de uso de animais da universidade federal do paraná (CEUA-UFPR), certificado N  730 e 1183 (anexo).

#### 2.4.18 Dermonecrose em coelhos

Para avaliar o papel da LiRecTCTP na lesão formada durante o envenenamento, 1 µg da toxina recombinante dermonecrótica (LiRecDT1) diluída em PBS foi injetado por via intradérmica em uma área de pele depilada de coelhos com ou sem a TCTP recombinante. Com a mesma finalidade 10 µg e 20 µg da LiRecTCTP (diluída em PBS), t mb m foram injetados. Utilizamos dois controles negativos: PBS (diluente) e uma proteína recombinante inerte

(GFP) e purificada sob as mesmas condições. O uso desse controle nos garantiria que potenciais contaminantes bacterianos não teriam influência nos resultados (controle negativo). A toxina dermonecrótica LiRecDT1 foi usada como controle positivo. Os coelhos foram escolhidos para esses experimentos porque reproduzem lesões dermonecróticas próximas às observadas nos acidentes com humanos (Chaim et al., 2011b). Esse experimento foi repetido com 2 animais e o desenvolvimento da necrose experimental foi observado em 1 h, 3 h, 6 h e 24 h após as injeções. Os procedimentos utilizados foram aprovados pela comissão de ética de uso de animais da universidade federal do paraná (CEUA-UFPR), certificado N  730 e 1183 (anexo).

#### 2.4.19 Análise Histológica

Após 24 horas da inoculação os coelhos foram anestesiados e eutanasiados. As peles foram removidas e fixadas em Bouin por 16 horas a temperatura ambiente. Após as amostras foram lavadas com álcool absoluto para remoção do fixador. As peles foram então desidratadas numa série de álcoois e depois embebidas em parafina. Os cortes foram processados e corados com Hematoxilina e Eosina (Chaim *et al.*, 2006). As imagens foram obtidas em Microscópio binocular Olympus BX41 (Olympus, Tóquio, Japão).

#### 2.4.20 Análise Estatística

Os resultados foram submetidos à análise estatística, sendo as repetições e o tratamento avaliados. Os resultados dos ensaios *in vivo* são apresentados pela média  $\pm$ S.E.M., e a análise estatística foi realizada utilizando análise de variância (ANOVA - simples); e para avaliar as diferenças entre os tratamentos e controle foi utilizado o teste de Tukey. A significância foi definida como \*  $p < 0,1$ ; \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  ou \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

## 2.5 RESULTADOS

A expressão da toxina recombinante LiRecTCTP foi realizada em cepa de expressão *E. Coli* BL21(DE3) pLysS em meio LB e induzida com 0,1 mM de IPTG. O tempo de expressão foi de 4 horas em agitação (200 rpm), de acordo com Sade e colaboradores (2012). A purificação da LiRecTCTP foi realizada por cromatografia de afinidade em condições nativas. Sade (2009) realizou a purificação da LiRecTCTP em dois passos de cromatografia, primeiro uma cromatografia de afinidade seguida de uma troca iônica. Apesar de obter a toxina com alto grau de pureza, os dois passos de purificação despendiam tempo e grande perda de toxina (Sade, 2009). Em 2012, Sade e colaboradores padronizaram uma purificação em condições híbridas, na qual a proteína após a purificação era desnaturada, lavada e renaturada ainda na coluna de cromatografia. Dessa forma foi possível obter a LiRecTCTP (aproximadamente 7 mg/L de cultura) com alto grau de pureza e apenas um passo de cromatografia. Apesar de bem estabelecido esse protocolo, problemas no redobramento da proteína geravam corpos de inclusão, os quais permaneciam ligados a coluna e por muitas vezes reduziram o rendimento. Dessa forma, padronizamos uma nova metodologia para purificação, apenas em um passo de cromatografia e em condições nativas favorecendo o correto dobramento. Para tanto utilizamos 35 mM de Imidazol durante as lavagens e 350 mM para eluição. O Imidazol possui afinidade pelo níquel possibilitando a purificação das proteínas (Sambrook, 2001). Na figura 14 podemos observar os resultados da expressão heteróloga da LiRecTCTP. Na coluna 1, amostra antes da indução, há ausência de expressão da proteína LiRecTCTP. Após o tempo de indução obtivemos uma banda de aproximadamente 24 KDa, referente à proteína de interesse (coluna 2). Após a realização da cromatografia de afinidade (coluna 4) obtivemos a proteína com alto grau de pureza (superior a 98%), necessário para a realização de experimentos de liberação de histamina e um rendimento de cerca de 16 mg/L de cultura bacteriana.

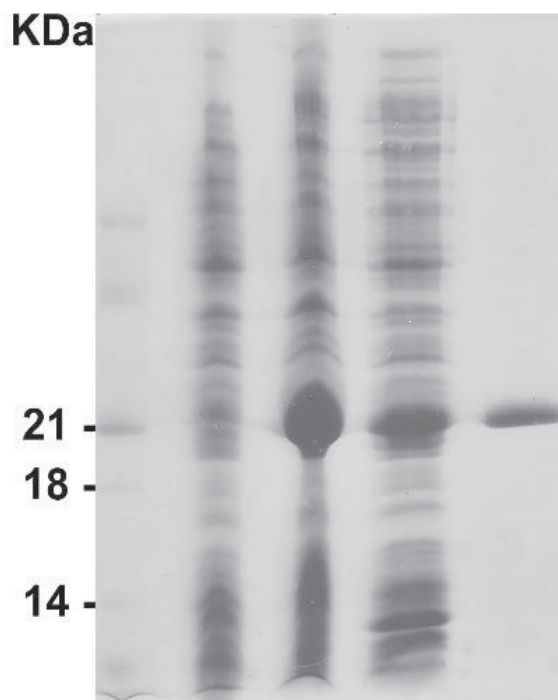
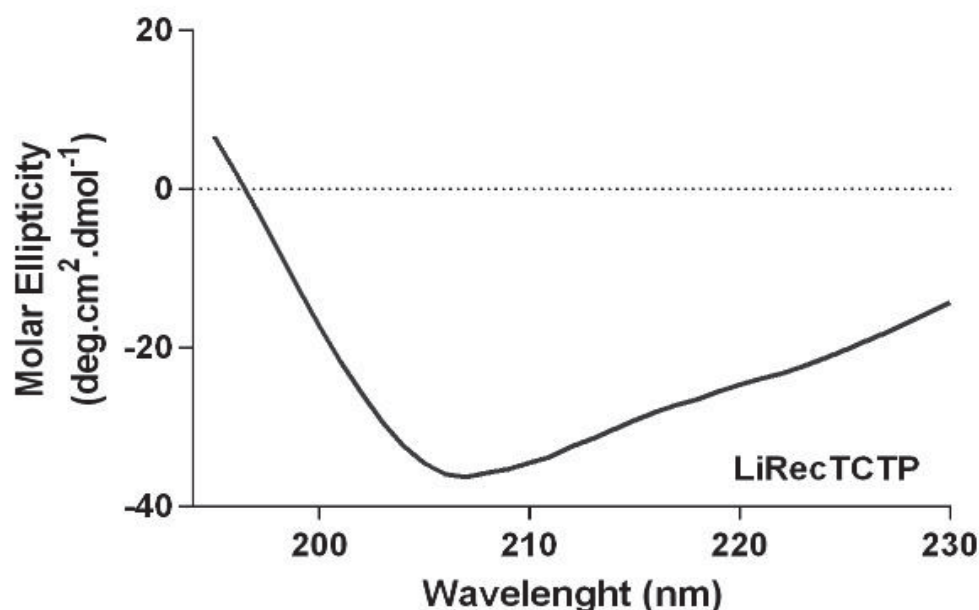


Figura 14: Expressão e Purificação da LiRecTCTP. Gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12,5% em condições redutoras: (1) cultura bacteriana antes da indução com IPTG; (2) cultura bacteriana após 4 horas de expressão; (3) *void* da cromatografia após a ligação com a resina  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA; (4) eluato da cromatografia indicando grau de pureza e mostrando a proteína LiRecTCTP em aproximadamente 24 kDa.

Com a proteína pura seguimos para análise das estruturas secundárias por dicroísmo circular (Figura 15). O gráfico demonstra a presença tanto de  $\alpha$ -hélices quanto folhas- $\beta$ . Quanto maior a região de pico, maior o número de regiões  $\alpha$ -hélice. A deconvolução dos dados revela que a LiRecTCTP é composta de 8,85% de  $\alpha$ -hélice e 33,61% de folhas- $\beta$ . Os 57,54% referem-se a estruturas não secundárias.



| CD DECONVOLUTION (%) |                 |                 |         |
|----------------------|-----------------|-----------------|---------|
| PROTEIN              | $\alpha$ -HELIX | $\beta$ -STRAND | OTHERS  |
| LiRecDTCTP           | 8.85 %          | 33.61 %         | 57.54 % |

Figura 15: **Dicroísmo Circular da LiRecTCTP**. Espectro de Dicroísmo Circular da LiRecTCTP em tampão fosfato e análise após deconvolução dos dados pelo programa K2D3 Web Server.

Para avaliar se as concentrações que seriam testadas posteriormente nos tratamentos não seriam tóxicas a células e assim gerando morte celular, foi realizado ensaio de viabilidade celular (Figura 16). As células foram expostas ao controle positivo de degranulação composto 48/80 e aos controles negativos PBS e LiRecDT1 H12A (toxina recombinante produzida pelo mesmo modelo de expressão que não apresenta atividade histaminérgica). As células foram tratadas com diferentes concentrações da proteína LiRecTCTP (10, 50 e 100  $\mu\text{g/mL}$ ) e do veneno (10, 50 e 100  $\mu\text{g/mL}$ ). Após 2 horas de tratamento podemos observar que nenhum dos tratamentos utilizados foi capaz de reduzir a viabilidade das células.



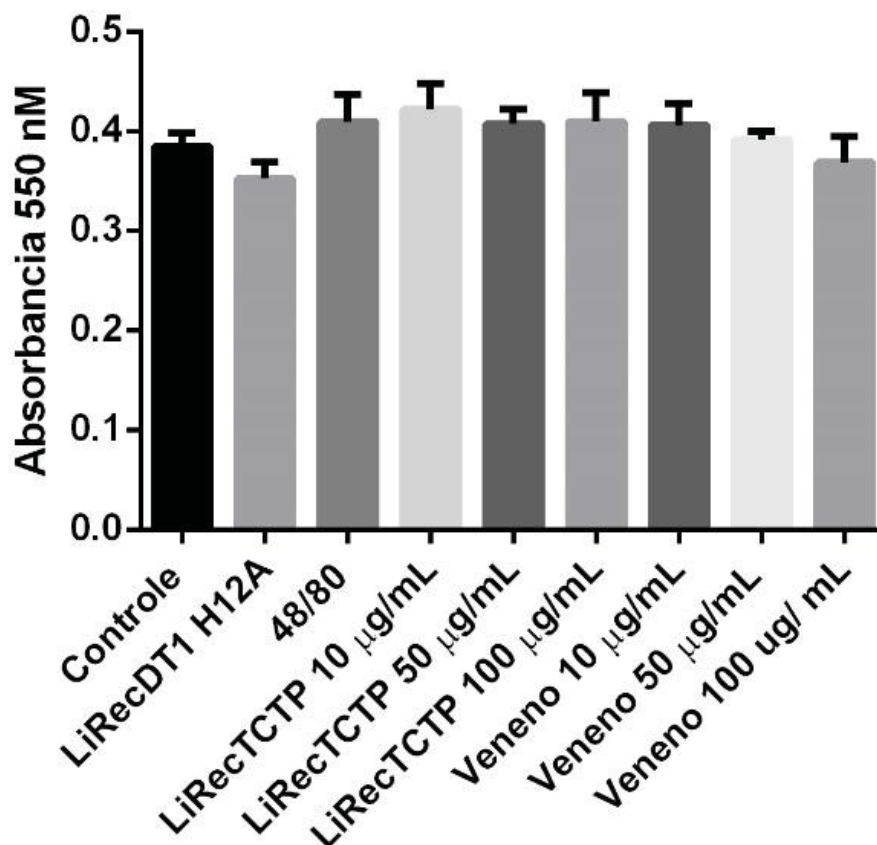


Figura 16: **Efeito da LiRecTCTP sob a viabilidade das células RBL-2H3.** As células ( $5 \times 10^5$  células/poço) foram incubadas com 10, 50 e 100 µg/mL por poço de proteína LiRecTCTP ou veneno de *L. intermedia*, composto 48/80 e PBS por 2 horas a 37°C. A viabilidade celular foi avaliada pelo método MTT. Os resultados foram expressos pelas médias das amostras em triplicata  $\pm$  SEM. Para cada ensaio foram realizados três experimentos independentes. \*\* $p < 0,01$  e \*\*\*\* $p < 0,0001$

Para avaliar maiores concentrações de LiRecTCTP e seu possível efeito citotóxico foi realizada a microscopia eletrônica de varredura das células expostas à LiRecTCTP. Na figura 15, podemos observar que o tratamento com 200 µg/mL gerou alterações morfológicas. A linhagem RBL-2H3 cresce aderida na placa e espalhada sobre o substrato, sendo observadas extensões de membrana como filopódios. Podemos observar que o tratamento com a dose mais alta da LiRecTCTP (200 µg/mL) induziu citotoxicidade nas células: há uma redução dos filopódios e presença de células mortas (Figura 17). Além disso, encontramos células em apoptose, liberando corpos apoptóticos, *blebs*. Células não viáveis são caracterizadas pela tendência de se soltar do substrato, perda de filopódios e presença de furos nas membranas. Nenhuma

dessas características foi observada no tratamento com 100  $\mu\text{g/mL}$  da LiRecTCTP e no controle. Portanto, esses dados sugerem que em concentrações inferiores a 100  $\mu\text{g/mL}$  da LiRecTCTP observamos a degranulação dos basófilos e que em concentrações superiores, como 200  $\mu\text{g/mL}$ , causam citotoxicidade levando a apoptose. (Figura 16)

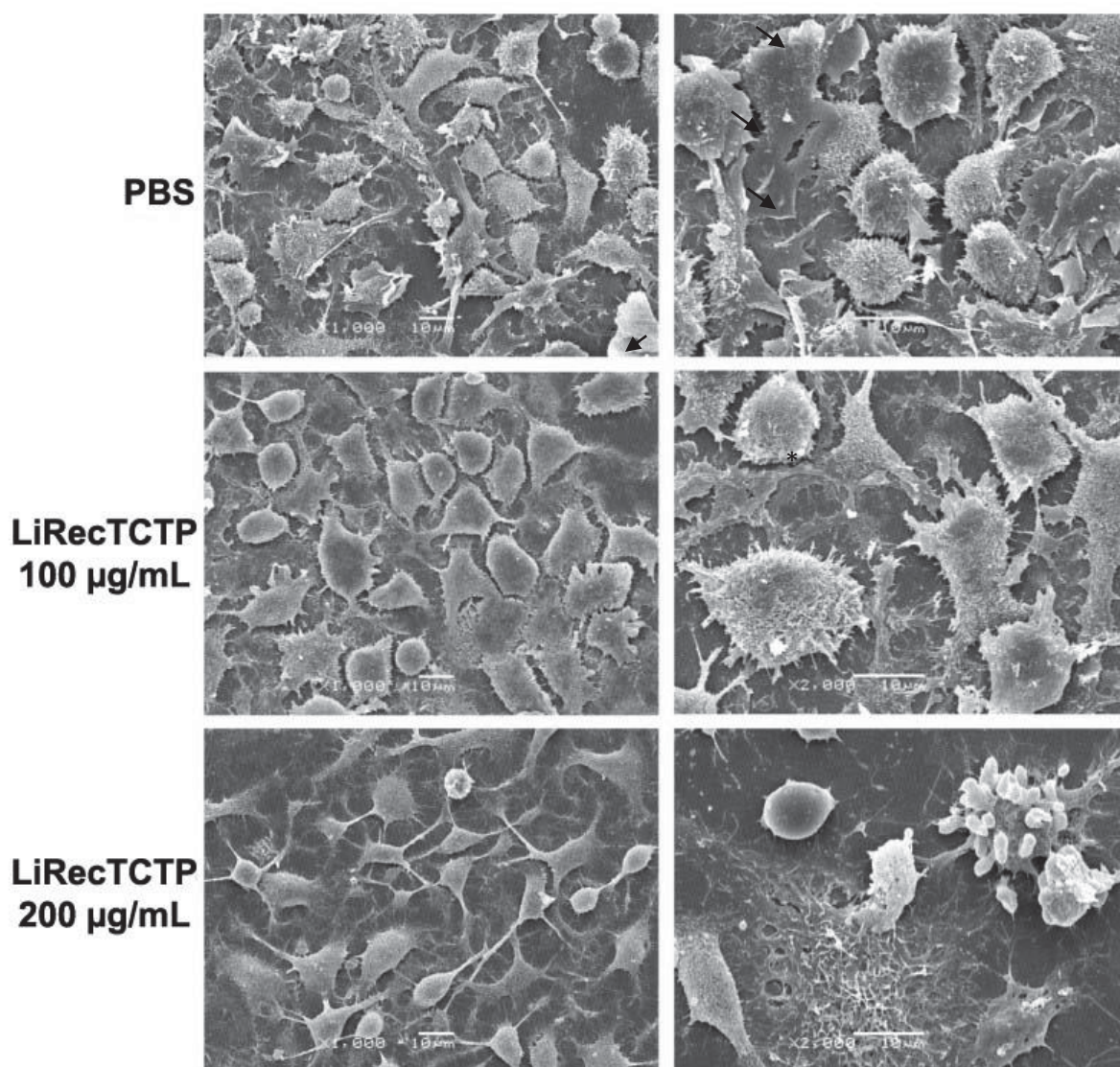


Figura 17: **Efeito da LiRecTCTP sobre morfologia das células RBL-2H3: Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).** Células RBL-2H3 foram incubadas com LiRecTCTP por 2 horas. Após foram fixadas e preparadas para microscopia MEV. As setas indicam os filopódios e os asteriscos as células em apoptose. Como controle foi utilizado PBS. As células foram tratadas com LiRecTCTP nas concentrações de 100 e 200  $\mu\text{g/mL}$ .

A fim de avaliar a liberação de histamina após a degranulação das células RBL-2H3 foi realizado ensaio dosagem da atividade da enzima  $\beta$ -hexosaminidase (Figura 18). A linhagem RBL-2H3 tem sido usada como modelo para estudar a secreção regulada em mastócitos (Passante e Frankish, 2009). Nesse ensaio foi utilizado o composto p-nitrofenil n-acetil-beta-d-glucosamina para avaliar a atividade de enzima  $\beta$ -hexosaminidase (liberada durante a degranulação), sendo, portanto, dosado o produto da reação, a  $\beta$ -hexosamina. Podemos observar que não houve aumento da atividade da enzima  $\beta$ -hexosaminidase quando as células foram tratadas com a toxina recombinante LiRecDT1 H12A (controle negativo, toxina produzida de forma recombinante mas sem atividade). Quando as células foram tratadas com o composto 48/80 (controle positivo) houve um aumento de aproximadamente 5 vezes na atividade da enzima liberada (Figura 18), sem alteração na viabilidade celular (Figuras 16). A exposição das células à toxina LiRecTCTP demonstrou um aumento da atividade  $\beta$ -hexosaminidase concentração dependente. Utilizando 5  $\mu\text{g/mL}$  da LiRecTCTP obtivemos um aumento de 3 vezes na atividade da enzima, enquanto a concentração de 10  $\mu\text{g/mL}$  gerou um aumento de 5,5 vezes na atividade da enzima.

Dessa forma podemos observar que um aumento nas concentrações da LiRecTCTP e veneno leva a um aumento da atividade de  $\beta$ -hexosaminidase (Figura 18), e que o aumento da atividade desta enzima não altera a viabilidade celular (Figuras 15 e 16).

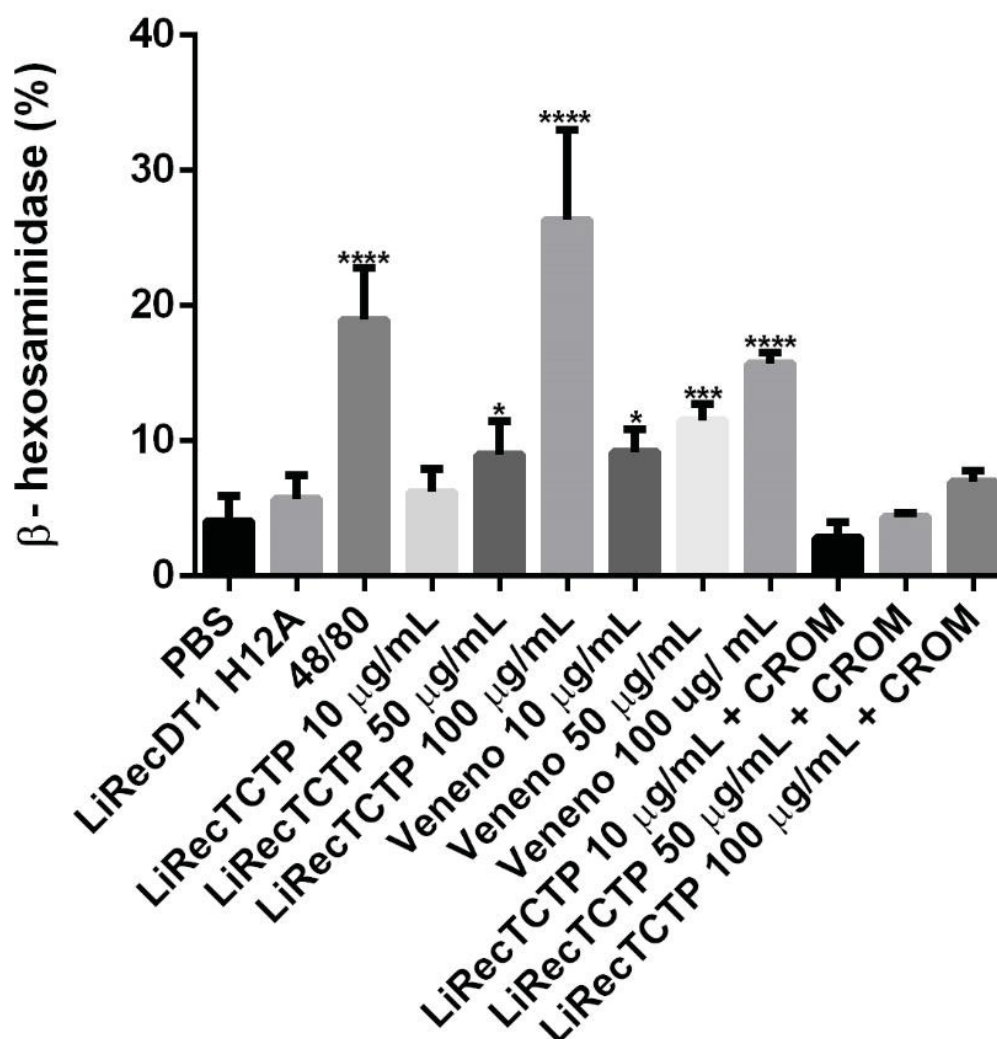


Figura 18: **Efeito da LiRecTCTP sob a liberação de  $\beta$ -hexosaminidase em RBL-2H3.** As células ( $5 \times 10^5$  células/poço) foram incubadas com 10, 50 e 100  $\mu$ g/mL por poço da toxina LiRecTCTP (na presença e ausência de cromoglicato de sódio- CROM) ou veneno de *L. intermedia*, composto 48/80 e PBS por 2 horas a 37°C. A atividade de  $\beta$ - hexosaminidase foi medida com a utilização de p-nitrofenil n-acetil-beta-d-glucosamina. Os resultados expressam a porcentagem do total de liberação de  $\beta$ - hexosaminidase. Os resultados foram expressos pelas medias das amostras em triplicata  $\pm$  SEM. Para cada ensaio foram realizados três experimentos independentes. \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001 e \*\*\*\*p<0,0001.

Sabendo que o cálcio é uma molécula sinalizadora muito importante em diversos processos celulares e que o influxo de cálcio está relacionado ao processo de degranulação foi realizado ensaio de influxo de cálcio (Figura 18). Para tanto as células RBL-2H3 foram expostas ao controle (PBS) e a diferentes concentrações da proteína LiRecTCTP (50 e 100  $\mu$ g/mL) em uma cinética de tempo (0-60 min). Podemos observar na figura 19 que a LiRecTCTP é capaz

de gerar influxo de cálcio de forma concentração dependente. Logo após 5 minutos de exposição podemos observar que o influxo de cálcio dentro da célula torna-se 1,3 vezes maior que o controle quando com 50 µg/mL da LiRecTCTP, e 1,6 vezes maior quando testado 100 µg/mL da LiRecTCTP. Além disso, utilizamos o inibidor de degranulação (cromoglicato de sódio) e podemos observar que ele foi capaz de inibir o influxo de cálcio na maior concentração da LiRecTCTP testada em todos os tempos analisados. Esse aumento do influxo de cálcio se mantém por todo tempo de reação testado.

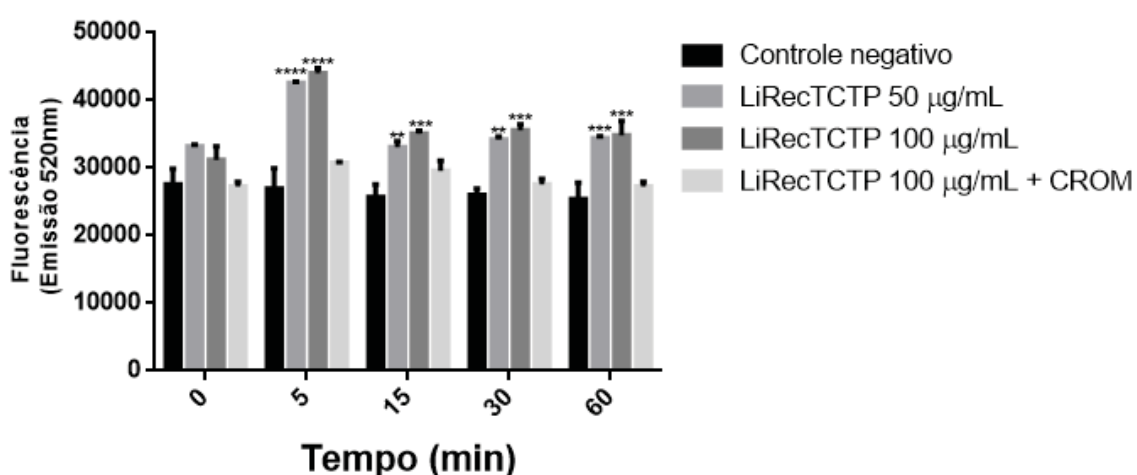


Figura 19: **Efeito da LiRecTCTP sobre o Influxo de cálcio em RBL-2H3.** Células RBL-2H3 na presença de fluo-4am foram incubadas com controle negativo PBS e LiRecTCTP na presença e ausência de cromoglicato de sódio (CROM). O aumento de cálcio intracelular foi medido pelo aumento da fluorescência em Tecan Infinite M200. Dois experimentos independentes (n=3). \*\* p < 0,01 e \*\*\* p < 0,001.

Sabendo que a LiRecTCTP é capaz de induzir o processo de degranulação em RBL-2H3 e mostrando a interação entre LiRecTCTP e RBL-2H3, resolvemos avaliar se o tratamento com LiRecTCTP seria capaz de induzir a expressão de interleucinas pró inflamatórias nestas células, como já descrito para TCTPs de outros organismos. Para tanto foi realizado PCR em tempo real para quantificação dos RNAs mensageiros de IL-3 e IL-4 após o tratamento das células com LiRecTCTP. Nós pudemos observar que após 2 horas de tratamento houve um aumento de RNA mensageiro para as interleucinas 3 e 4. Observamos um aumento de 50% de IL-3 quando



utilizamos 100 µg/mL da LiRecTCTP. Para IL-4 observamos aumento de cerca de 25% quando utilizamos 100 µg/mL. Dessa forma, podemos observar que o tratamento com LiRecTCTP é capaz de induzir o aumento na expressão de interleucinas (3 e 4) nas células RBL-2H3 (figura 20).

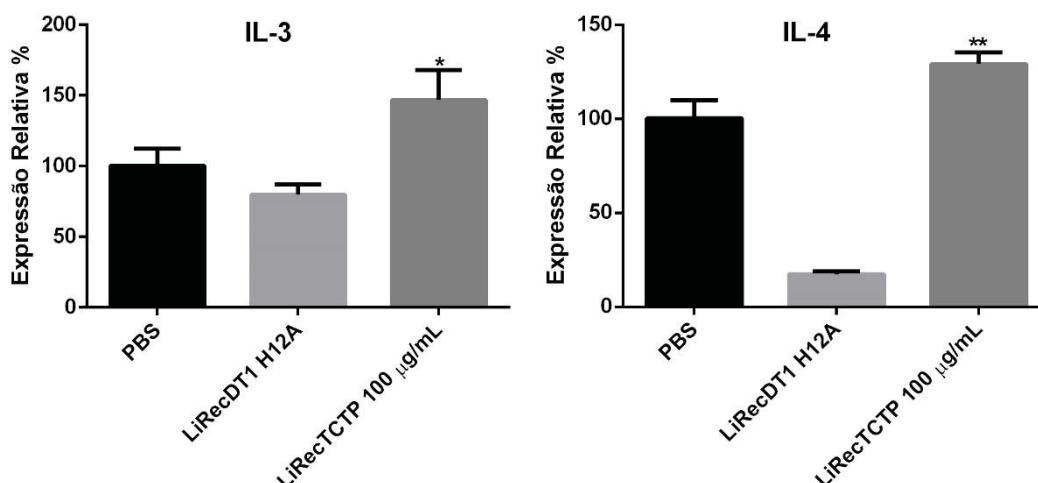


Figura 20: **Porcentagem da expressão relativa de interleucinas em RBL-2H3 após tratamento com LiRecTCTP.** Análise por PCR em tempo real dos níveis de IL-3 e IL4 após tratamento com 100 µg/mL da LiRecTCTP. Para quantificação foi empregado o método  $\Delta\Delta Ct$ , utilizando GAPDH como padrão endógeno para cada amostra. Os dados obtidos foram analisados utilizando ANOVA (one way) (n=3), foram realizados dois experimentos independentes (\*p<0,1; \*\*p<0,01).

Nossos dados demonstram que a LiRecTCTP é capaz de degranular células RBL-2H3. Este tratamento leva ao aumento de interleucinas pró-inflamatórias (IL-3 e IL-4) e a um aumento do influxo de cálcio *in vitro*. Além disso, quando utilizamos o inibidor de degranulação, cromoglicato de sódio, podemos inibir o influxo de cálcio e, conseqüentemente, a degranulação induzida por LiRecTCTP. Dessa forma, o passo seguinte foi avaliar o papel dessa toxina *in vivo*, para melhor compreender seu mecanismo de ação.

A LiRecTCTP já havia sido envolvida nos processos de aumento de permeabilidade e geração de edema *in vivo* em camundongos (Sade *et al.*, 2012). A fim de melhor compreender a participação da LiRecTCTP neste processo inflamatório *in vivo* testamos o efeito da LiRecTCTP em associação

com drogas inibidoras de diferentes receptores de histamina e de degranulação. Utilizando o corante Evans Blue avaliamos o aumento na permeabilidade vascular causada pela LiRecTCTP por meio do extravasamento do corante em camundongos. Os animais primeiramente foram tratados com os fármacos inibidores de receptores histaminérgicos, com posterior injeção do corante intravascular, usando PBS como controle negativo e para o teste da proteína recombinante. As peles foram fotografadas após 1 hora e analisadas com posterior quantificação do corante (Figura 21). Podemos observar que quando tratados com PBS (controle negativo) não houve extravasamento do corante. Em contrapartida, quando expomos o camundongo somente com a LiRecTCTP, sem o uso de inibidores, obtivemos o extravasamento mais acentuado. Quando os camundongos foram tratados com as drogas inibidoras observamos que a extravasamento de líquido intersticial foi inibido (menor quantidade do corante extravasado). Os resultados mostram que LiRecTCTP foi capaz de liberar histamina, a qual teve sua ação reduzida pelas drogas em ordem crescente de inibição: cimetidina < prometazina < tioperamida. A proteína recombinante LiRecTCTP foi capaz de aumentar o extravasamento de corante em aproximadamente 60% se comparada ao controle PBS. Da mesma forma a utilização do cromoglicato reduziu o extravasamento em 60%, resultado foi semelhante ao controle negativo. Já a prometazina e a tioperamida obtiveram uma redução do extravasamento e, conseqüentemente, da permeabilidade muito semelhante, aproximadamente 13%. A cimetidina, inibidor de receptor H2, não foi capaz de gerar uma redução significativa do extravasamento do corante.



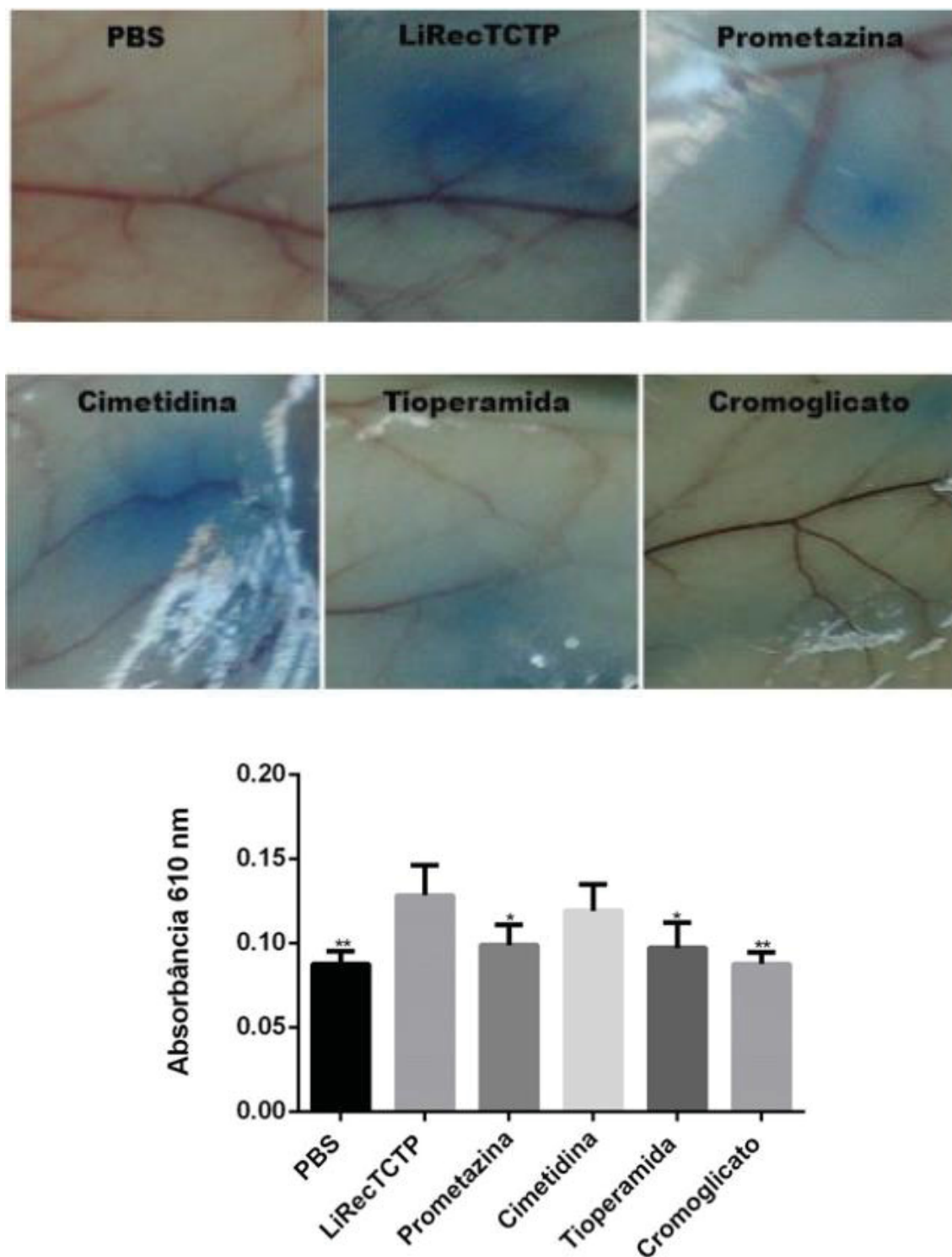
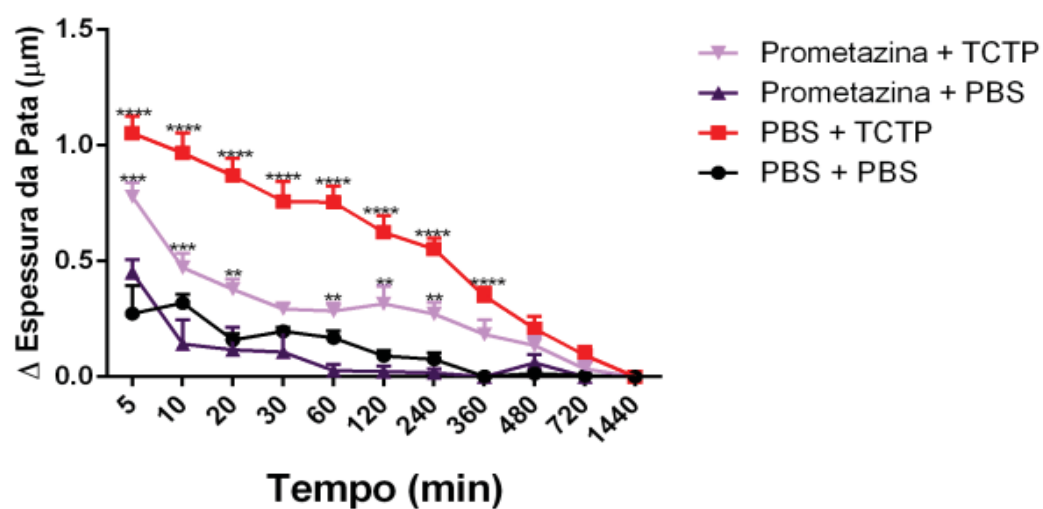


Figura 21: Efeito da LiRecTCTP na permeabilidade vascular *in vivo* por meio do ensaio de extravasamento do corante Evans blue na presença de inibidores de receptores de histamina. (A) Imagens da pele dos animais na região da inoculação intradérmica das amostras: PBS (controle negativo) ou 10  $\mu$ g da LiRecTCTP em animal não tratado ou tratado previamente com os inibidores (prometazina, cimetidina, tioperamida e cromoglicato). (B) O gráfico corresponde à eluição dos corantes para medida da absorbância em 610 nm (n=5).

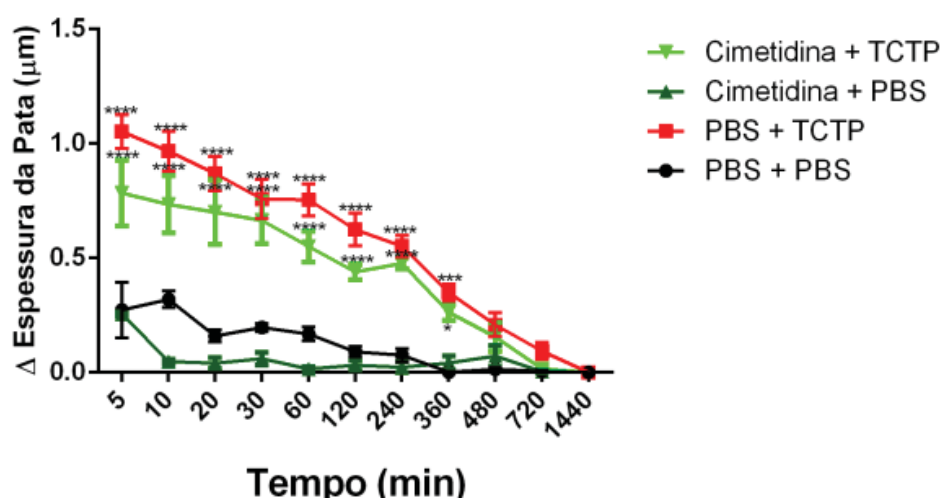
Foram realizados dois experimentos isolados com 10 animais em cada grupo, sendo a análise estatística realizada em comparação a LiRecTCTP \* $p < 0,1$ ; \*\* $p < 0,01$ .

No Loxoscelismo, a resposta inflamatória exacerbada causada pelo veneno de aranha marrom (*L. intermedia*) leva a um aumento na permeabilidade vascular e consequente formação de edema (Sade *et al.*, 2012). Dessa forma, avaliamos o efeito de anti-histamínicos na formação de edema causada pela inoculação da LiRecTCTP em camundongos. Os tratamentos com os anti-histamínicos foram realizados por vias, doses e tempos específicos da posologia específica de cada droga. Sendo que o tempo 0 foi medido antes da injeção de 10  $\mu$ l da LiRecTCTP ou de 10  $\mu$ l de PBS, no caso dos controles, na pata dos animais. A análise estatística foi realizada entre os fármacos/ LiRecTCTP e fármacos /PBS, e também entre PBS/ LiRecTCTP e PBS/PBS. Podemos observar na figura 22 o aumento da espessura da pata do animal logo após a administração, no início, devido ao volume injetado. No gráfico A podemos observar a alteração na atividade endematogênica quando os animais foram tratados com prometazina. Ocorre uma discreta alteração no perfil após o tratamento, muito semelhante ao que ocorreu após o tratamento com a tioperamida (gráfico C). No caso da cimetidina (gráfico B), cimetidina/LiRecTCTP e PBS/ LiRecTCTP apresentaram um perfil semelhante, após 6 horas (360 minutos), sem diferença significativa com os controles (cimetidina/ PBS e PBS/ PBS, respectivamente). O gráfico D (cromoglicato) apresenta um perfil completamente diferente, a curva mais acentuada representa os dados obtidos com a administração da LiRecTCTP. A utilização do cromoglicato inibiu de forma muito significativa a formação do edema, sendo os dados da toxina inibida por essa droga muito semelhantes aos encontrados nos controles negativos.

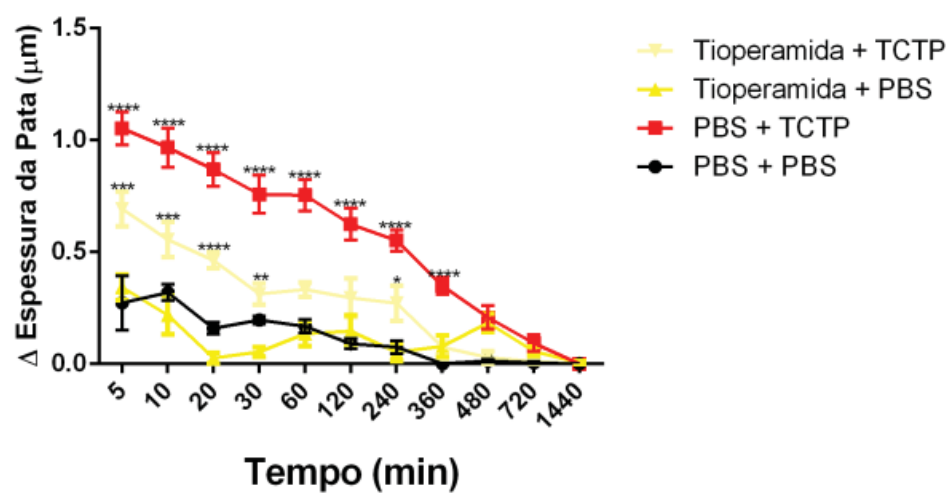
A



B



C



D

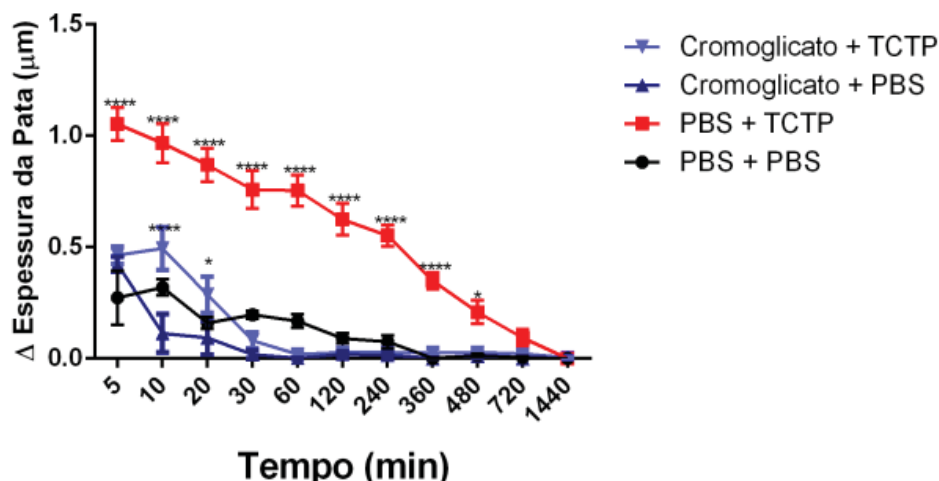


Figura 22: **Avaliação do efeito edematogênico da LiRecTCTP na ausência e presença de anti-histamínicos.** Os animais foram previamente tratados com os anti-histamínicos (100  $\mu$ l de acordo com cada via e tempo de administração específica de cada fármaco), e no momento do ensaio com injeção de PBS (10  $\mu$ l), como controle negativo e LiRecTCTP (10  $\mu$ l), a pata foi medida usando um micrômetro digital nos seguintes tempos: 0, 5, 10, 20, 30, 60, 120, 240, 360, 720, 1440 min. Gráfico A: tratamento com prometazina (inibidor de HR1); gráfico B: pré-tratamento com cimetidina (inibidor HR1); gráfico C: tratamento com tioperamida (inibidor HR3 e HR4); gráfico D: tratamento com cromoglicato (inibidor de degranulação de mastócitos). Foram realizados dois experimentos (n=5) \*p<0,1; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001; \*\*\*\*p<0,003.

A comparação entre os fármacos (Figura 23) confirma os dados obtidos com os anti-histamínicos na permeabilidade vascular, sendo o cromoglicato o fármaco com efeito inibidor mais significativo sobre a LiRecTCTP. Este inibidor de degranulação de mastócitos foi capaz de reduzir drasticamente o edema de pata gerado pela LiRecTCTP. Após a injeção a redução do edema já é de aproximadamente 50%, e ainda reduz até praticamente zerar o edema em 1 hora. Comparando o efeito isolado da LiRecTCTP com o efeito gerado após a injeção dos inibidores de histamina, podemos observar que, o inibidor de receptor H2 cimetidina foi capaz de reduzir significativamente o edema de pata somente até 10 min após a injeção. Tanto a prometazina (inibidor H1) quanto a tioperamida (inibidor de H3 e H4) reduziram em aproximadamente 25% o edema causado pela LiRecTCTP. Após 2 horas ambas as drogas foram capazes de reduzir em 75% o edema, sendo que a tioperamida praticamente zerou o edema após 6 horas e a prometazina em 12 horas. Esses dados

corroboram com os resultados encontrados no ensaio de permeabilidade vascular (Figura 20).

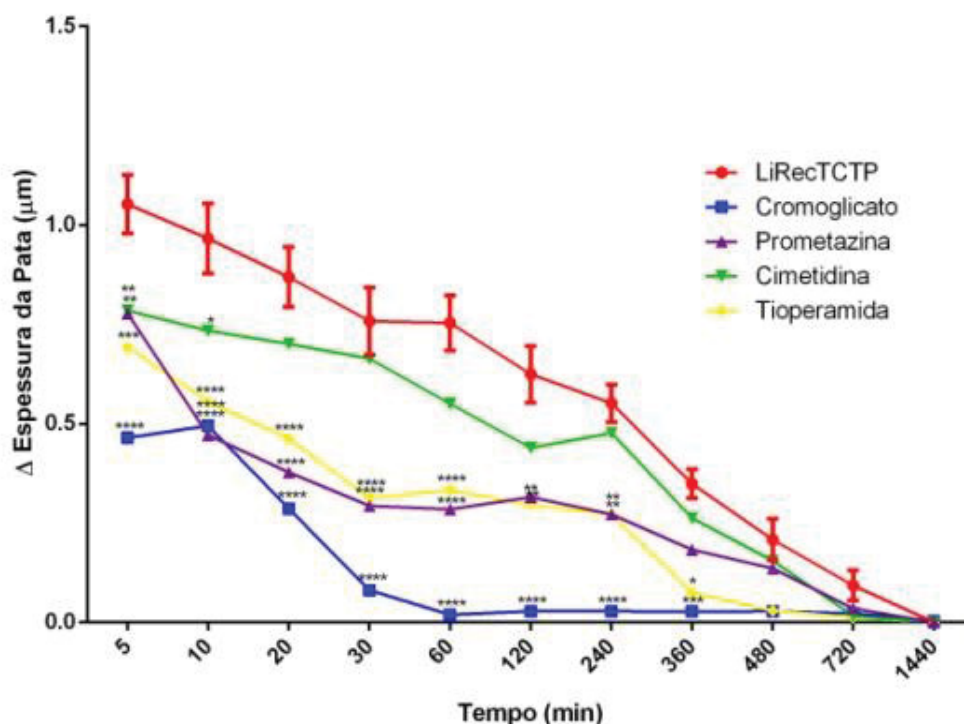


Figura 23: **Avaliação do efeito edematogênico da LiRecTCTP em animais com a administração prévia de anti-histamínicos.** Foram realizados dois experimentos (n=5) \*p<0,1; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001; \*\*\*\*p<0,003.

Para investigar a participação da LiRecTCTP no quadro de envenenamento por *Loxosceles* foram realizados experimentos *in vivo* de dermonecrose utilizando coelhos neozelandeses. Injeções intradérmicas da toxina dermonecrótica LiRecDT1 (controle positivo), PBS e GFP (controles negativos) e LiRecTCTP isolada ou combinada a LiRecDT1 foram realizadas. A indução da dermonecrose macroscópica na pele dos coelhos foi observada em 1, 3, 6 e 24 h e pode-se constatar que a LiRecDT1 isolada e combinada com a LiRecTCTP foi capaz de gerar dermonecrose. Por outro lado, a LiRecTCTP isolada e os controles negativos não desenvolveram lesões dermonecróticas. Observamos apenas eritema nas lesões geradas pela LiRecTCTP. Enquanto a combinação de LiRecDT1 com LiRecTCTP apresentou um edema bastante

pronunciado, superior ao desenvolvido pela LiRecDT1 isolada sendo esse dependente da concentração da LiRecTCTP (Figura 24).

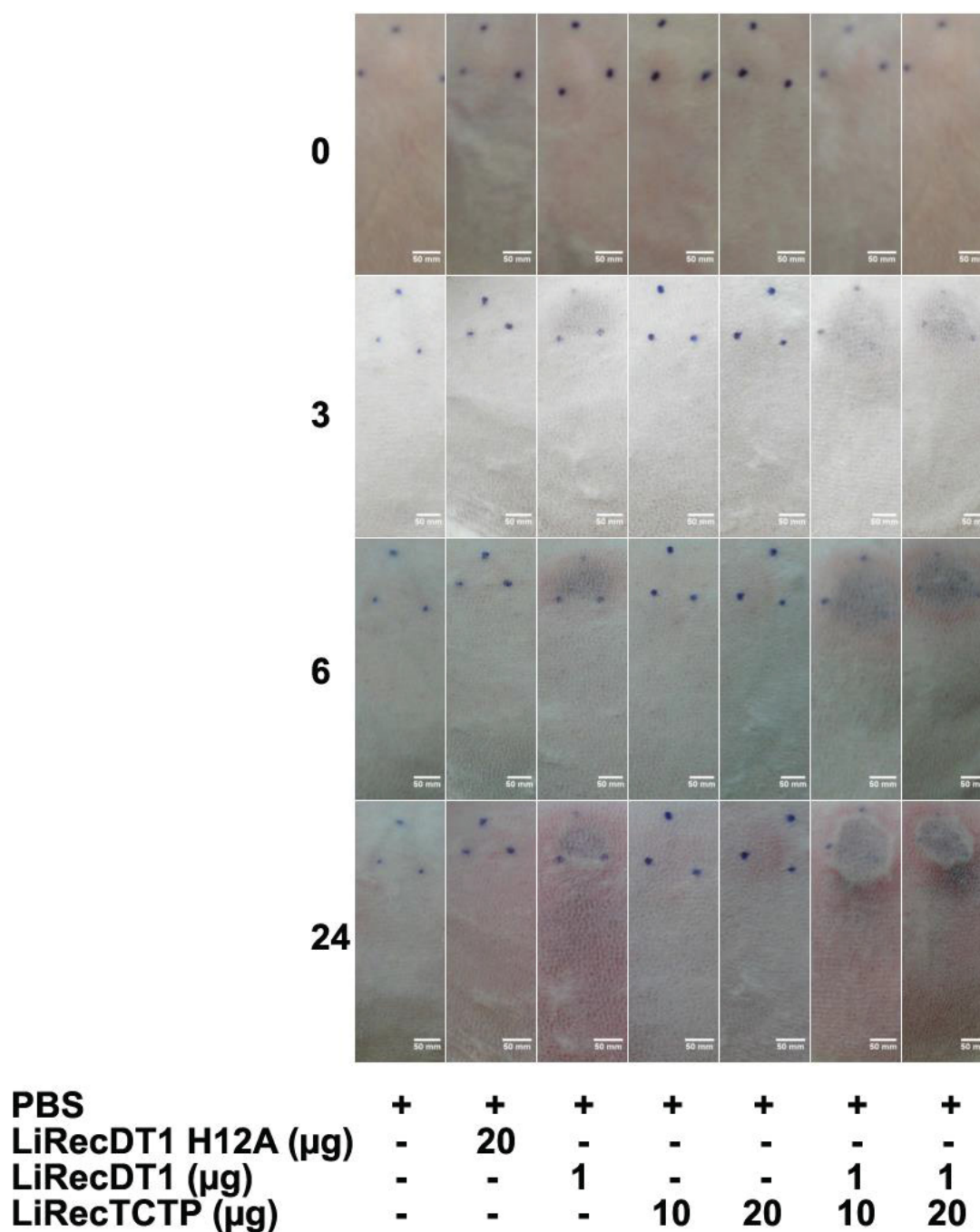


Figura 24: **Efeitos da LiRecTCTP *in vivo*: alterações macroscópicas em pele de coelho expostas as toxinas do veneno de *L. intermedia*.** Alterações macroscópicas em pele de coelho fotografadas em 0, 1, 3, 6 e 24 horas após o tratamento. Os coelhos foram injetados com PBS e GFP (controle negativo), LiRecDT1 1 µg (controle positivo), LiRecTCTP nas concentrações de 10 e 20 µg e a combinação de LiRecDT1 1µg com LiRecTCTP nas concentrações de 10 e 20 µg. As injeções foram aplicadas no centro de cada triângulo indicado



por três pontos. A escala é mostrada do lado direito de cada imagem de representa 0,5 cm. Foram utilizados dois coelhos no experimento.

A fim de melhor compreender o papel da TCTP no envenenamento, foram realizadas análises microscópicas das peles dos coelhos (Figura 25). Nas porções de pele tratadas com PBS e LiRecDT1 H12A (controles negativos), não podemos observar nenhuma alteração morfológica, as camadas da pele estavam preservadas assim como as fibras de colágeno. Nas porções de pele onde foram inoculadas tanto a LiRecDT1 quanto a LiRecTCTP observamos um aumento no infiltrado leucocitário. A LiRecDT1, mesmo em baixa concentração (1 µg) foi capaz de recrutar mais células se comparada a LiRecTCTP isolada em suas duas concentrações testadas (10 e 20 µg). Porém, quando combinamos a LiRecTCTP a LiRecDT1 observamos um recrutamento de leucócitos ainda maior do que aquele observado nos tratamentos isolados, sendo esse dependente da concentração da LiRecTCTP utilizada.

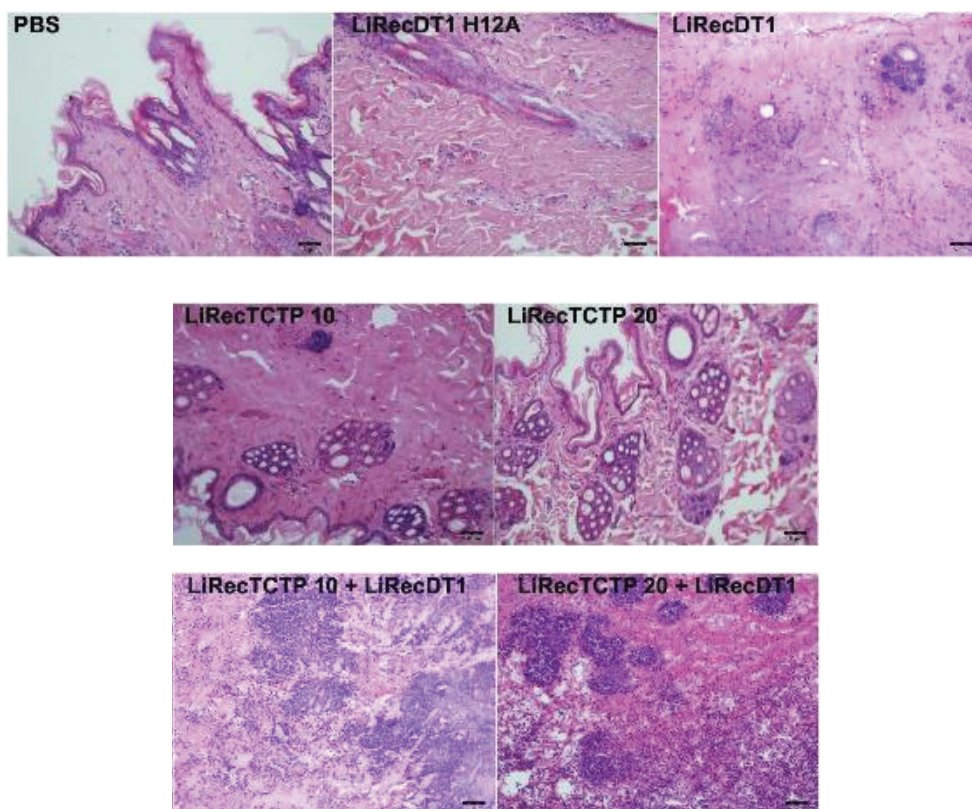




Figura 25: **Efeitos da LiRecTCTP *in vivo*: alterações microscópicas em pele de coelho expostas às toxinas do veneno de *L. intermedia*.** Alterações microscópicas em pele de coelho fotografadas 24 horas após o tratamento. Os coelhos foram injetados com PBS e GFP (controle negativo), LiRecDT1 1 µg (controle positivo), LiTCTP nas concentrações de 10 e 20 µg e a combinação de LiRecDT1 1 µg com LiTCTP nas concentrações de 10 e 20 µg. A escala é mostrada do lado direito de cada imagem. Foram utilizados dois coelhos no experimento. Imagens representativas de dois experimentos.

Por fim, visto que a LiRecTCTP foi capaz de aumentar significativamente o edema no ensaio de dermonecrose, avaliamos o efeito sinérgico da LiRecTCTP e LiRecDT1 quanto ao aumento da permeabilidade vascular (Figura 26). Os camundongos inoculados com PBS e GFP (controles negativos) não apresentaram extravasamento do corante Azul de Evans. Quando nos camundongos que foram tratados com as toxinas LiRecTCTP (5 e 10 µg) e LiRecDT1 (1 µg) isoladas observamos um aumento da permeabilidade vascular pelo extravasamento do corante. O extravasamento de corante gerado pela LiRecTCTP foi concentração dependente. Além disso, quando as toxinas foram combinadas observamos um aumento da permeabilidade vascular dependente da concentração da LiRecTCTP.

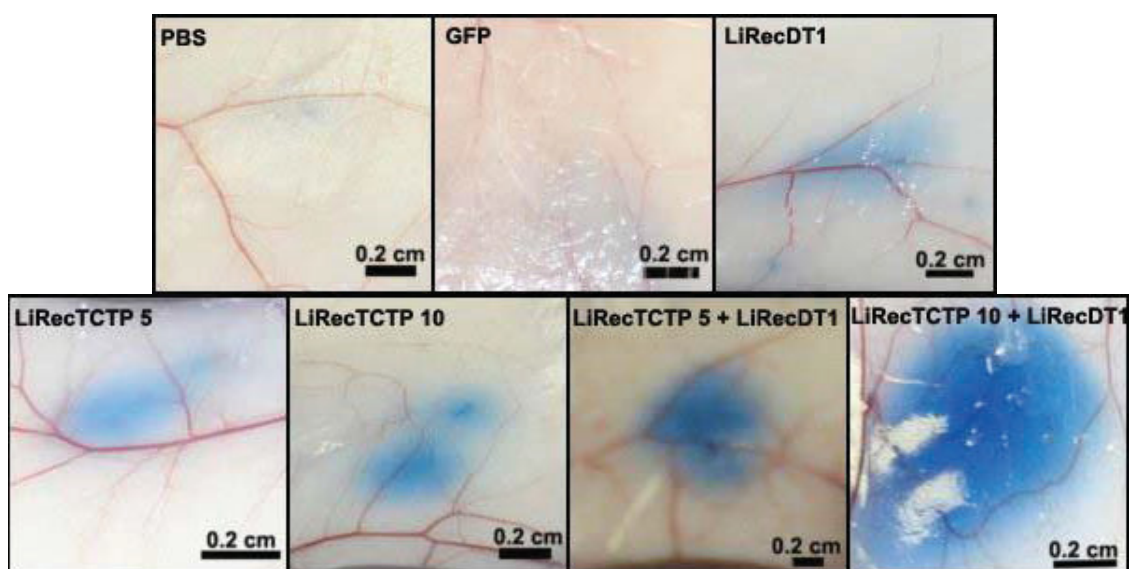


Figura 26: Efeito sinérgico da LiRecTCTP e LiRecDT1 na permeabilidade vascular *in vivo* através do extravasamento do corante Azul de Evans. Imagens da pele dos animais na região da inoculação intradérmica das amostras: PBS e GFP (controle negativo), LiRecDT1 1 µg, 5 e 10 µg da LiRecTCTP e a combinação LiRecDT1 1 µg com 5 e 10 µg da LiRecTCTP. Imagens representativas de dois experimentos com 10 animais cada grupo.

Dessa forma, nossos resultados relacionam a TCTP de aranha-marrom ao processo inflamatório decorrente do loxoscelismo. Além disso, demonstram que essa proteína isoladamente é capaz de degranular basófilos, e gerar aumento de citocinas pró-inflamatórias, bem como, aumento dos níveis de cálcio intracelular. Os resultados da avaliação dos anti-histamínicos sugerem as possíveis interações da LiRecTCTP como receptores de histamina.

### 3.6 DISCUSSÃO

Em vertebrados, TCTPs são conhecidas como fatores de liberação de histamina (HRF) dependentes de IgE por liberar histamina e assim induzir uma resposta pró-inflamatória. A histamina é um importante regulador da atividade das células NK, bem como possui atividade pró-inflamatória, podendo ser liberada imediatamente nas fases iniciais da inflamação. Entretanto, muitos homólogos da TCTP têm sido identificados em invertebrados e, até recentemente, não existiam evidências do envolvimento das TCTPs de invertebrados na liberação de histamina (Sade *et al.*, 2012). Todavia, Jia e colaboradores (2017), tentando compreender o papel da TCTP de um molusco (Zhikong scallop *Chlamys farreri*) observaram que a TCTP desse invertebrado é capaz de atuar como um fator de liberação de histamina.

Até o presente momento não foram descritos ensaios *in vivo* utilizando proteínas da família TCTP como fator de liberação de histamina, porém em ensaios utilizando basófilos e a linhagem celular basofílica RBL-2H3 a proteína TCTP humana foi capaz de promover a liberação de histamina e de interleucina IL-8 (Macdonald *et al.*, 2001; Mulenga *et al.*, 2003; Macdonald, 2012).

A histamina é uma molécula chave na cascata alergênica e, consequentemente, também os mastócitos são células chave no processo. A rápida liberação de mediadores como histamina, citocinas, quimosinas e mediadores derivados de lipídeos dos mastócitos induz a anafilaxia sistêmica, uma reação alérgica que pode levar a morte do indivíduo. Os mastócitos são derivados de precursores das células brancas sanguíneas e estão distribuídos amplamente no tecido conjuntivo e na superfície das mucosas. Dessa forma, os mastócitos são células importantes para o entendimento das desordens alérgicas. Estudos anteriores já caracterizaram o papel de composto 48/80 ou IgE na transdução de sinal na via dos mastócitos gerando ativação de proteína G que leva a liberação de histamina por essas células. Como resultado, há um aumento na passagem de cálcio pela membrana, gerando aumento dos níveis de cálcio intracelular nos mastócitos. A utilização de quelantes de cálcio como EDTA inibe a mobilização de cálcio e a degranulação via Fc $\epsilon$ r1 (receptor de IgE). Dessa forma o cálcio possui um papel chave na regulação da degranulação (Chakraborty *et al.*, 2017).

Os basófilos compartilham muitas das características dos mastócitos, incluindo a expressão de FcεR1, secreção de citocinas, coloração metacromática e liberação de histamina após a ativação. Uma das características dos basófilos é sua expressão rápida e potente de interleucinas (IL-4 e IL-13). Embora tenham funções semelhantes aos mastócitos, envolvidos nas respostas alérgicas e regulação imune, eles possuem funções únicas. O principal mediador armazenado nos grânulos dos basófilos é a histamina. A histamina complexa-se com proteoglicanos nos grânulos, preferencialmente condroitin-sulfato e dissocia-se após exocitose por troca iônica e alteração no valor de pH (Stone *et al.*, 2010).

A proteína TCTP, mesmo estando presente em pequena quantidade no veneno, pode ser responsável pela liberação de histamina observada nos eventos inflamatórios desencadeados pelo envenenamento. Já foi descrito que o veneno de aranha-marrom possui um componente termolábil e não dialisável, relacionado com a atividade histaminérgica do veneno (Rattmann *et al.*, 2008). A presença da histamina no local do envenenamento causa dor, edema e contribui para o espalhamento do veneno (Mekori e Metcalfe, 2000). A proteína TCTP de *Loxosceles intermedia* identificada na glândula de veneno da aranha poderia estar envolvida com a ação histaminérgica do veneno, uma vez que possui alto grau de identidade com fatores de liberação de histamina descritos em diversas espécies (Paludo *et al.*, 2009; Sade *et al.*, 2012).

SADE e colaboradores (2012), através da análise filogenética demonstraram que a TCTP de *L. intermedia* tende a ficar agrupada com proteínas TCTP de carrapatos, já descritas como fatores de liberação de histamina. Em carrapatos a atividade de liberação de histamina foi descrita primeiramente na espécie *Demacentor variabilis*. Esta proteína foi identificada por imunoensaio na saliva do animal e sua proteína recombinante foi capaz de promover a liberação de histamina na linhagem celular basofílica RBL-2H3 (Mulenga *et al.*, 2003).

Para a análise do papel da LiTCTP foi realizada expressão heteróloga segundo Sade e colaboradores (2012). Após a expressão, a purificação foi realizada em apenas um passo de cromatografia em condições nativas, possibilitando assim o correto dobramento da proteína. A fim de avaliar as

estruturas secundárias e a solubilidade da LiRecTCTP foi realizado dicroísmo circular. Nessa análise pudemos identificar a presença de  $\alpha$ -helice e folhas- $\beta$ , o que garante a solubilidade da proteína. Um espectro de dicroísmo circular com um mínimo de aproximadamente 205 nm e um ombro em 222 nm é característico de proteínas com  $\alpha$ -helice e folhas- $\beta$ , respectivamente. O gráfico obtido na análise apresenta essas características e é muito semelhante ao encontrado por Lucas e colaboradores (2014) no estudo da TCTP humana. Além disso, a análise dos cristais obtidos por Susini e colaboradores (2008) no estudo da TCTP humana indica a presença de 3  $\alpha$ -helices e 9 folhas- $\beta$ . Dessa forma os dados obtidos após a deconvolução corroboram os dados obtidos por Susini (2008). As TCTPs são proteínas muito conservadas entre os eucariotos. Além disso, a TCTP humana já foi descrita como um fator de liberação de histamina (Bommer e Thiele, 2004; Sade *et al.*, 2012).

A avaliação da degranulação da linhagem RBL-2H3 após tratamento com LiRecTCTP ou veneno total de *L. intermedia* foi realizada em ensaios *in vitro* utilizando a atividade da enzima  $\beta$ -hexoaminidase. A RBL-2H3 é uma linhagem celular de leucemia basofílica, a qual tem sido amplamente empregada no estudo da ativação e degranulação de mastócitos, da estrutura do receptor Fc $\epsilon$ R1 e de rotas bioquímicas (Huang *et al.*, 2008; Kimura *et al.*, 2015; Tavora *et al.*, 2016). A secreção de  $\beta$ -hexoaminidase é um marcador de degranulação dos mastócitos e basófilos. Já é descrito que células, como as RBL-2H3, sensibilizadas (anti-DNP-IgE) e estimuladas por um antígeno modelo (DNPBSA), sofrem degranulação e assim ocorre a liberação de mediadores químicos de resposta alérgica, incluindo a enzima  $\beta$ -hexosaminidase (Naal *et al.*, 2004; Kimura *et al.*, 2015; Tavora *et al.*, 2016).

Nossos resultados (Figura 18) mostram que a exposição à toxina LiRecTCTP e ao veneno total de *L. intermedia* geram significativa degranulação em basófilos, mesmo sem sensibilização dos receptores para IgE. Além disso, pode-se verificar que a liberação de  $\beta$ -hexosaminidase é concentração dependente. Esses resultados sugerem que a LiRecTCTP possa ser o componente responsável pela liberação de histamina no loxoscelismo. O controle positivo foi o composto 48/80 é formado por uma mistura de p- Metoxi-N- MetilFeniletilamina ligado ao formaldeído. É assumido que o composto 48/80 ativa e degranula mastócitos (Rattmann *et al.*, 2008). Como controle

negativo foi utilizada a proteína LiRecDT1H12A, pois ela é uma proteína recombinante que passou pelos mesmos processos de obtenção que a proteína LiRecTCTP, garantindo assim que a degranulação dos mastócitos não é produto da ação de moléculas de origem bacteriana provenientes da expressão em modelo procarioto. Nossos dados demonstram que concentração de 50 µg/mL a LiRecTCTP foi capaz de aumentar 3 vezes a atividade de β-hexosaminidase sem alteração na viabilidade dessas células e na concentração de 100 µg/mL a LiRecTCTP é capaz de aumentar a atividade de β-hexosaminidase em até 5 vezes na concentração, sem alteração na viabilidade celular. Além disso, quando as células foram expostas a LiRecTCTP e ao inibidor de degranulação (cromoglicato de sódio), não foi observada liberação de β-hexosaminidase em todas as concentrações da toxina testadas. O Cromoglicato de sódio atua inibindo o influxo de cálcio e assim a liberação de mediadores e o processo de degranulação de mastócitos e basófilos (Mazurek *et al.*, 1983; Kimura *et al.*, 2015). Esse efeito aliado aos dados encontrados pela microscopia eletrônica de varredura sugerem um efeito citotóxico da toxina nas células RBL-2H3 somente em mais altas concentrações, visto que o processo de degranulação por si só não é lítico (Stone *et al.*, 2010).

Nesse estudo o tratamento de células RBL-2H3 com a LiRecTCTP resultou em aumento nos níveis intracelulares de cálcio, o qual foi inibido na presença do cromoglicato de sódio. Sabe-se que a ativação de mastócitos é dependente do aumento da concentração citosólica de cálcio, a qual está associada com a liberação de estoques intracelulares e influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular através dos SOCs (*store-operated calcium channels*) (Yang *et al.*, 2013). Tem sido sugerido que o aumento intracelular de cálcio através dos SOCs é essencial para degranulação dos mastócitos e basófilos (Fewtrell e Sherman, 1987). O influxo de cálcio e a degranulação das células estão intimamente relacionados (Blank e Rivera, 2004). A degranulação da RBL-2H3 é dependente de  $\text{Ca}^{2+}$  e o aumento intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  caracterizado pela entrada através de SOCs é essencial para liberação do conteúdo dos grânulos (Fewtrell e Sherman, 1987; Yang *et al.*, 2013). No processo de degranulação de mastócitos, o cálcio, como segundo mensageiro, possui um papel crítico. Os níveis de cálcio intracelular regulam a exocitose dos grânulos dos mastócitos,

bem como a expressão de citocinas inflamatórias. O movimento de cálcio através da membrana dos mastócitos está associado com a estimulação e secreção de mediadores (Chakraborty *et al.*, 2017).

Dados da literatura mostram que a TCTP não possui somente a capacidade de liberar histamina, mas também induz a liberação de interleucinas de basófilos (IL-4 e IL-13) e eosinófilos (IL-8). Além disso, no ambiente extracelular, a TCTP funciona como um fator de crescimento e de ativação de linfócitos do tipo B (Kang *et al.*, 2001; Macdonald *et al.*, 2001). O mecanismo pelo qual a TCTP induz a liberação de histamina é pouco conhecido. O tratamento de basófilos com TCTP inicia um processo de sinalização semelhante ao mediado por IgE, entretanto sem a fosforilação do receptor de IgE e por uma via diferente da que é induzida por IL-3. A degranulação de basófilos em resposta à proteína TCTP depende ainda de PIP3, ativação de PI3K e Akt (Vonakis *et al.*, 2008; Macdonald, 2012). Análises de citometria de fluxo revelaram que a proteína liga-se à superfície de basófilos humanos de doadores que foram responsivos ou não à TCTP, ou seja, que promoveram ou não a liberação de histamina (Macdonald, 2012). Nossos resultados demonstram que a TCTP de *L. intermedia* é capaz de liberar histamina e induzir a liberação de interleucinas (IL-3 e IL-4) de basófilos.

IL-3 promove a maturação dos basófilos e possibilita a ativação dos basófilos maduros e então secreção de IL-4. A secreção de IL-3 é dependente da ativação do receptor FcεRI ligado à IgE. IL-4 é um dos marcadores de alergia mais relevantes que é produzido por em grandes quantidades por basófilos se comparado a outras células do sistema imune. Essa citocina é liberada quando o basófilo é degranulado em conjunto com outros mediadores como a histamina, dependente ou não de IgE (Schroeder, 2011). Os basófilos apresentam FcεRI completo ( $\alpha\beta\gamma 2$ ), cuja sinalização para expressão superficial se correlaciona diretamente com concentração de IgE livre. Agregação do receptor FcεRI ligado à IgE por antígenos multivalentes leva ativação basófila, exocitose granular e liberação de mediadores. As proteínas do complemento C3a e C5a também ativam basófilos através de seus receptores na superfície dos basófilos. IL-3, IL-5, GM-CSF, fator de liberação de histamina (HRF), bem como várias quimiocinas, levam a degranulação dos basófilos e secreção de IL-4 e IL-13 após a ativação do FcεRI. Os receptores do tipo *Toll* (TLR2 e TLR



4), ativados durante a resposta inata, também são expressos em basófilos e a sua ativação leva a secreção de IL-4 e IL-13 e potencialização da ativação induzida por IgE e não-IgE. Similarmente, IL-33, um membro da superfamília IL-1, ativa basófilos através do receptor ST2 resultando na expressão de IL-4 e IL-13 e na potencialização da degranulação mediada por IgE (Stone *et al.*, 2010).

Nossos dados corroboram Sade e colaboradores (2012) e mostram que LiRecTCTP é capaz de gerar um aumento na permeabilidade vascular e edema num curto intervalo de tempo (Figuras 20 e 21). A avaliação de inibidores específicos de receptores de histamina: prometazina (inibidor de receptor H1), cimetidina (inibidor de receptor H2), tioperamida (inibidor de receptor H3 e H4), bem como um inibidor de degranulação de mastócitos, o cromoglicato de sódio (Kimura *et al.*, 2015) evidenciou que a LiRecTCTP é capaz de liberar histamina. A histamina é um importante mediador químico que causa vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular. A utilização do cromoglicato de sódio reduziu a permeabilidade vascular e o edema provavelmente por prevenir a degranulação dos mastócitos e basófilos e assim inibir a liberação de moléculas como a histamina e outros mediadores vasoativos (Kimura *et al.*, 2015). Os resultados deixam claro a capacidade de inibição de cada composto e consequentemente a liberação de da histamina pela LiRecTCTP (Figuras 20 e 22). Observamos uma inibição pela tioperamida (receptor H3 e H4) > prometazina (receptor H1) > cimetidina (receptor H2). Esses dados refletem a localização e função de cada um dos receptores. Os 4 subtipos de receptores (H1, H2, H3 e H4) são acoplados a proteína G, e diferem entre si nas vias de segundos mensageiros e na sua distribuição tecidual. Os receptores H1 são expressos primariamente nas células endoteliais vasculares e nas células musculares lisas. Esses receptores medeiam reações inflamatórias e alérgicas. A principal função do receptor H2 consiste em mediar a secreção de ácido gástrico no estômago, receptores H3 e H4 ainda não tem suas funções muito bem definidas, mas estão presentes em mastócitos, basófilos e eosinófilos e medeiam reações inflamatórias (Faustino-Rocha *et al.*, 2016; Branco e Yoshikawa, 2018).

A inflamação é um mecanismo utilizado no reparo do tecido após injúria e consiste em uma cascata celular e reações microvasculares. Essa cascata inclui edema, aumento da permeabilidade vascular e migração de diferentes tipos celulares em direção a injúria tecidual (Schmid-Schonbein, 2006). Os componentes do veneno de *L. intermedia* atuam em sinergismo na composição do quadro clínico decorrente da picada (Ribeiro *et al.*, 2007; Paludo *et al.*, 2009). A presença de histamina no envenenamento causa dor, edema, eritema, vasodilatação e mudanças na permeabilidade vascular. Tudo isso contribui para a dispersão sistêmica dos componentes do veneno (Paludo *et al.*, 2009). SADE e colaboradores (2012) demonstraram o efeito relevante da LiRecTCTP isolada em comparação com o veneno total na formação de edema em camundongos sendo o tamanho do edema concentração dependente (Paludo *et al.*, 2009; Sade *et al.*, 2012). Os resultados dos nossos ensaios *in vivo*, avaliando o efeito da LiRecTCTP no envenenamento através do ensaio de dermonecrose em coelhos demonstraram que, assim como encontrado por Sade e colaboradores (2012), a LiRecTCTP está envolvida no processo inflamatório decorrente do loxoscelismo. A aplicação da LiRecTCTP resultou em eritema no local e a injeção combinada da LiRecTCTP com LiRecDT1 levou a um aumento da permeabilidade vascular e edema de forma concentração dependente. Além disso, a análise microscópica das peles indicou um aumento do infiltrado leucocitário, se comparado as inoculações das proteínas isoladas. A ativação de mastócitos e basófilos leva a secreção de moléculas vasoativas e mediadores inflamatórios como histamina, serotonina, TNF, entre outras que propagam ainda mais a ativação dos mastócitos e o processo de inflamação (Theoharides *et al.*, 2012). Dessa forma a LiRecTCTP pode estar contribuindo para a resposta inflamatória exacerbada decorrente do loxoscelismo, por degranular mastócitos e basófilos e assim ampliar a gama de moléculas sinalizadoras como histamina e citocinas pró inflamatórias.

Dessa forma, esse trabalho reforça o importante papel da TCTP nos eventos inflamatórios decorrentes do loxoscelismo, bem como avança na caracterização da LiRecTCTP como um fator de liberação de histamina, que pode atuar degranulando mastócitos e basófilos. Contudo, ainda serão necessários mais estudos para melhor compreender e caracterizar essa

proteína no contexto do loxoscelismo e buscar possíveis aplicações biotecnológicas.

#### 4. CONCLUSÃO

Esse estudo teve por finalidade entender o papel da TCTP no processo de reversão tumoral em modelos de melanoma, bem como avaliar o potencial terapêutico da sertralina. Além disso, estudar a participação da LiTCTP no quadro clínico decorrente do Loxoscelismo, relacionada com sua atividade como um fator de liberação de histamina.

A TCTP é uma proteína importante no melanoma humano e murino, relacionada com as características de agressividade e metastáticas destes tumores. A sertralina, uma droga capaz de reduzir os níveis proteicos de TCTP, inibiu a capacidade das células de melanoma de gerar clones e de migrar, além de reduzir sua viabilidade e inibir o crescimento tumoral *in vivo* em modelos animais. Além disso, seus efeitos persistiram após a retirada do tratamento. A sertralina destaca-se como droga de interesse para o tratamento multimodal do melanoma, além de ser também uma estratégia de reestabelecimento da atividade de P53.

Em relação a TCTP de *L. intermedia*, podemos caracterizar essa proteína como um fator de liberação de histamina, capaz de liberar histamina de mastócitos e basófilos, interleucina 3 e 4 de basófilos. A inibição dos receptores de histamina impede os efeitos histaminérgicos da LiRecTCTP *in vitro* e *in vivo*, assim como a inibição da degranulação. Além disso, confirmamos a participação da TCTP no quadro clínico do loxoscelismo, com ação edematogênica e na permeabilidade vascular.

Nossos resultados avançam no entendimento dos papéis da proteína TCTP tanto no processo de reversão tumoral, quanto como um fator de histamina.

## REFERENCIAS

ACUNZO, J. et al. TCTP as therapeutic target in cancers. **Cancer Treat Rev**, v. 40, n. 6, p. 760-9, Jul 2014. ISSN 0305-7372.

ADAM, Y. G.; EFRON, G. Cutaneous malignant melanoma: current views on pathogenesis, diagnosis, and surgical management. **Surgery**, v. 93, n. 4, p. 481-94, Apr 1983. ISSN 0039-6060 (Print)

0039-6060.

AMBROSIO, M. R. et al. Expression of Translationally Controlled Tumor Protein in Human Kidney and in Renal Cell Carcinoma. **Biomed Res Int**, v. 2015, p. 730390, 2015.

AMIT, B. H. et al. Proapoptotic and chemosensitizing effects of selective serotonin reuptake inhibitors on T cell lymphoma/leukemia (Jurkat) in vitro. **Eur Neuropsychopharmacol**, v. 19, n. 10, p. 726-34, Oct 2009. ISSN 0924-977x.

AMSON, R.; KARP, J. E.; TELERMAN, A. Lessons from tumor reversion for cancer treatment. **Curr Opin Oncol**, v. 25, n. 1, p. 59-65, Jan 2013. ISSN 1040-8746.

AMSON, R. et al. Reciprocal repression between P53 and TCTP. **Nat Med**, v. 18, n. 1, p. 91-9, Jan 2012. ISSN 1078-8956.

AMSON, R. et al. TPT1/ TCTP-regulated pathways in phenotypic reprogramming. **Trends Cell Biol**, v. 23, n. 1, p. 37-46, Jan 2013. ISSN 0962-8924.

AMZALLAG, N. et al. TSAP6 facilitates the secretion of translationally controlled tumor protein/histamine-releasing factor via a nonclassical pathway. **J Biol Chem**, v. 279, n. 44, p. 46104-12, Oct 29 2004. ISSN 0021-9258 (Print)

0021-9258.

APPEL, M. H. et al. Identification, cloning and functional characterization of a novel dermonecrotic toxin (phospholipase D) from brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom. **Biochim Biophys Acta**, v. 1780, n. 2, p. 167-78, Feb 2008. ISSN 0006-3002 (Print)

0006-3002.

ARIS, M.; MORDOH, J.; BARRIO, M. M. Immunomodulatory Monoclonal Antibodies in Combined Immunotherapy Trials for Cutaneous Melanoma. **Frontiers in Immunology**, v. 8, p. 1024, 08/25

06/30/received

08/08/accepted 2017. ISSN 1664-3224. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5609554/>>.

BAE, S. Y. et al. Translationally controlled tumor protein induces epithelial to mesenchymal transition and promotes cell migration, invasion and metastasis. **Sci Rep**, v. 5, p. 8061, Jan 27 2015. ISSN 2045-2322.

BARTLEY, K. et al. Histamine release factor from *Dermanyssus gallinae* (De Geer): characterization and in vitro assessment as a protective antigen. **Int J Parasitol**, v. 39, n. 4, p. 447-56, Mar 2009. ISSN 0020-7519.

BASTIAN, B. C. The molecular pathology of melanoma: an integrated taxonomy of melanocytic neoplasia. **Annu Rev Pathol**, v. 9, p. 239-71, 2014. ISSN 1553-4006.

BAYLOT, V. et al. Targeting TCTP as a new therapeutic strategy in castration-resistant prostate cancer. **Mol Ther**, v. 20, n. 12, p. 2244-56, Dec 2012. ISSN 1525-0016.

BAZILE, F. et al. Complex relationship between TCTP, microtubules and actin microfilaments regulates cell shape in normal and cancer cells. **Carcinogenesis**, v. 30, n. 4, p. 555-65, Apr 2009. ISSN 0143-3334.

BHEEKHA-ESCURA, R. et al. Human recombinant histamine-releasing factor activates human eosinophils and the eosinophilic cell line, AML14-3D10. **Blood**, v. 96, n. 6, p. 2191-8, Sep 15 2000. ISSN 0006-4971 (Print)

0006-4971.

BHISUTTHIBHAN, J.; MESHNICK, S. R. Immunoprecipitation of [(3)H]dihydroartemisinin translationally controlled tumor protein (TCTP) adducts from *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes by using anti-TCTP antibodies. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 45, n. 8, p. 2397-9, Aug 2001. ISSN 0066-4804 (Print)

0066-4804.

BLANK, U.; RIVERA, J. The ins and outs of IgE-dependent mast-cell exocytosis. **Trends Immunol**, v. 25, n. 5, p. 266-73, May 2004. ISSN 1471-4906 (Print)

1471-4906.

BOMMER, U.-A. Cellular Function and Regulation of the Translationally Controlled Tumour Protein TCTP **The Open Allergy Journal**, v. 5, p. 19-32, 2012.

BOMMER, U. A.; THIELE, B. J. The translationally controlled tumour protein (TCTP). **Int J Biochem Cell Biol**, v. 36, n. 3, p. 379-85, Mar 2004. ISSN 1357-2725 (Print)

1357-2725.

BOMMER, U. A. et al. Translationally controlled tumour protein TCTP is induced early in human colorectal tumours and contributes to the resistance of HCT116 colon cancer cells to 5-FU and oxaliplatin. **Cell Commun Signal**, v. 15, n. 1, p. 9, Feb 01 2017. ISSN 1478-811x.

BOTTINO, M. A. et al. New paths to neurotology in Brazil. **Braz J Otorhinolaryngol**, v. 75, n. 5, p. 622, Sep-Oct 2009. ISSN 1808-8686.

BRANCO, A.; YOSHIKAWA, F. S. Y. Role of Histamine in Modulating the Immune Response and Inflammation. v. 2018, p. 9524075, 2018. ISSN 0962-9351.

BUCH, D. R. et al. Brown spider (*Loxosceles* genus) venom toxins: Evaluation of biological conservation by immune cross-reactivity. **Toxicon**, v. 108, p. 154-66, Dec 15 2015. ISSN 0041-0101.

BURGESS, A. et al. Chfr interacts and colocalizes with TCTP to the mitotic spindle. **Oncogene**, v. 27, n. 42, p. 5554-66, Sep 18 2008. ISSN 0950-9232.

CANS, C. et al. Translationally controlled tumor protein acts as a guanine nucleotide dissociation inhibitor on the translation elongation factor eEF1A. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 24, p. 13892-7, Nov 25 2003. ISSN 0027-8424 (Print)

0027-8424.

CHAIM, O. M. et al. Brown spider dermonecrotic toxin directly induces nephrotoxicity. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 211, n. 1, p. 64-77, Feb 15 2006. ISSN 0041-008X (Print)

0041-008x.

CHAIM, O. M. et al. Brown spider (*Loxosceles* genus) venom toxins: tools for biological purposes. **Toxins (Basel)**, v. 3, n. 3, p. 309-44, Mar 2011. ISSN 2072-6651.

CHAKRABORTY, S. et al. Inhibitory effect of a new orally active cedrol-loaded nanostructured lipid carrier on compound 48/80-induced mast cell degranulation and anaphylactic shock in mice. **Int J Nanomedicine**, v. 12, p. 4849-4868, 2017. ISSN 1176-9114.

CHAN, T. H.; CHEN, L.; GUAN, X. Y. Role of translationally controlled tumor protein in cancer progression. **Biochem Res Int**, v. 2012, p. 369384, 2012.

CHAN, T. H. et al. Translationally controlled tumor protein induces mitotic defects and chromosome missegregation in hepatocellular carcinoma development. **Hepatology**, v. 55, n. 2, p. 491-505, Feb 2012. ISSN 0270-9139.



CHEN, Y. et al. Physical and functional antagonism between tumor suppressor protein p53 and fortilin, an anti-apoptotic protein. **J Biol Chem**, v. 286, n. 37, p. 32575-85, Sep 16 2011. ISSN 0021-9258.

CHUNG, S. et al. Expression of translationally controlled tumor protein mRNA in human colon cancer. **Cancer Lett**, v. 156, n. 2, p. 185-90, Aug 11 2000. ISSN 0304-3835 (Print)  
0304-3835.

DA SILVA, P. H. et al. Brown spiders and loxoscelism. **Toxicon**, v. 44, n. 7, p. 693-709, Dec 01 2004. ISSN 0041-0101 (Print)  
0041-0101.

DAVIES, H. et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. **Nature**, v. 417, n. 6892, p. 949-54, Jun 27 2002. ISSN 0028-0836 (Print)  
0028-0836.

DEVITT, B. et al. Clinical outcome and pathological features associated with NRAS mutation in cutaneous melanoma. **Pigment Cell Melanoma Res**, v. 24, n. 4, p. 666-72, Aug 2011. ISSN 1755-1471.

DRINBERG, V. et al. Modulating cancer multidrug resistance by sertraline in combination with a nanomedicine. **Cancer Lett**, v. 354, n. 2, p. 290-8, Nov 28 2014. ISSN 0304-3835.

EFFERTH, T. Willmar Schwabe Award 2006: antiplasmodial and antitumor activity of artemisinin--from bench to bedside. **Planta Med**, v. 73, n. 4, p. 299-309, Apr 2007. ISSN 0032-0943 (Print)  
0032-0943.

FANG, D. et al. A tumorigenic subpopulation with stem cell properties in melanomas. **Cancer Res**, v. 65, n. 20, p. 9328-37, Oct 15 2005. ISSN 0008-5472 (Print)  
0008-5472.

FAUSTINO-ROCHA, A. I. et al. Antihistamines as promising drugs in cancer therapy. **Life Sci**, Dec 13 2016. ISSN 0024-3205.

FEITOSA, L. et al. Detection and characterization of metalloproteinases with gelatinolytic, fibronectinolytic and fibrinogenolytic activities in brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom. **Toxicon**, v. 36, n. 7, p. 1039-51, Jul 1998. ISSN 0041-0101 (Print)  
0041-0101.

FERREIRA, M. B. AVALIAÇÃO DO PAPEL DA PROTEÍNA TCTP EM MELANOMA MURINO (B16-F1 E B16-F10). **Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular)- Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Paraná.**, 2014.

FEWTRELL, C.; SHERMAN, E. IgE receptor-activated calcium permeability pathway in rat basophilic leukemia cells: measurement of the unidirectional influx of calcium using quin2-buffered cells. **Biochemistry**, v. 26, n. 22, p. 6995-7003, Nov 03 1987. ISSN 0006-2960 (Print)

0006-2960.

FUNSTON, G. et al. Binding of Translationally Controlled Tumour Protein to the N-terminal domain of HDM2 is inhibited by nutlin-3. **PLoS One**, v. 7, n. 8, p. e42642, 2012. ISSN 1932-6203.

GACHET, Y. et al. The growth-related, translationally controlled protein P23 has properties of a tubulin binding protein and associates transiently with microtubules during the cell cycle. **J Cell Sci**, v. 112 ( Pt 8), p. 1257-71, Apr 1999. ISSN 0021-9533 (Print)

0021-9533.

GE, F. et al. Quantitative proteomic analysis of tumor reversion in multiple myeloma cells. **J Proteome Res**, v. 10, n. 2, p. 845-55, Feb 04 2011. ISSN 1535-3893.

GLITZA, I. C.; DAVIES, M. A. Genotyping of cutaneous melanoma. **Chin Clin Oncol**, v. 3, n. 3, p. 27, Sep 2014. ISSN 2304-3865.

GNANASEKAR, M. et al. Gene silencing of translationally controlled tumor protein (TCTP) by siRNA inhibits cell growth and induces apoptosis of human prostate cancer cells. **Int J Oncol**, v. 34, n. 5, p. 1241-6, May 2009. ISSN 1019-6439 (Print)

1019-6439.

GORMAN, J. M. Treating generalized anxiety disorder. **J Clin Psychiatry**, v. 64 Suppl 2, p. 24-9, 2003. ISSN 0160-6689 (Print)

0160-6689.

GRAY-SCHOPFER, V. C. et al. Cellular senescence in naevi and immortalisation in melanoma: a role for p16? **Br J Cancer**, v. 95, n. 4, p. 496-505, Aug 21 2006. ISSN 0007-0920 (Print)

0007-0920.

GREIST, J. H. et al. Efficacy and tolerability of serotonin transport inhibitors in obsessive-compulsive disorder. A meta-analysis. **Arch Gen Psychiatry**, v. 52, n. 1, p. 53-60, Jan 1995. ISSN 0003-990X (Print)

0003-990x.

GREMSKI, L. H. et al. A novel expression profile of the *Loxosceles intermedia* spider venomous gland revealed by transcriptome analysis. **Mol Biosyst**, v. 6, n. 12, p. 2403-16, Dec 2010. ISSN 1742-2051.

GREMSKI, L. H. et al. Recent advances in the understanding of brown spider venoms: From the biology of spiders to the molecular mechanisms of toxins. **Toxicon**, v. 83, p. 91-120, Jun 2014. ISSN 0041-0101.

HAYASAKA, Y. et al. Dose equivalents of antidepressants: Evidence-based recommendations from randomized controlled trials. **J Affect Disord**, v. 180, p. 179-84, Jul 15 2015. ISSN 0165-0327.

HINOJOSA-MOYA, J. et al. Phylogenetic and structural analysis of translationally controlled tumor proteins. **J Mol Evol**, v. 66, n. 5, p. 472-83, May 2008. ISSN 0022-2844 (Print)

0022-2844.

HIRANO, T. et al. The Fab fragment of anti-IgE Cepsilon2 domain prevents allergic reactions through interacting with IgE-FcepsilonRIalpha complex on rat mast cells. **Sci Rep**, v. 8, n. 1, p. 14237, Sep 24 2018. ISSN 2045-2322.

HOCKER, T.; TSAO, H. Ultraviolet radiation and melanoma: a systematic review and analysis of reported sequence variants. **Hum Mutat**, v. 28, n. 6, p. 578-88, Jun 2007. ISSN 1059-7794.

HSU, Y. C. et al. Drosophila TCTP is essential for growth and proliferation through regulation of dRheb GTPase. **Nature**, v. 445, n. 7129, p. 785-8, Feb 15 2007. ISSN 0028-0836.

HUANG, F. et al. Inhibition of the antigen-induced activation of RBL-2H3 cells by Gab2 siRNA. **Cell Mol Immunol**, v. 5, n. 6, p. 433-8, Dec 2008. ISSN 1672-7681.

HUSSEIN, M. R.; HAEMEL, A. K.; WOOD, G. S. Apoptosis and melanoma: molecular mechanisms. **J Pathol**, v. 199, n. 3, p. 275-88, Mar 2003. ISSN 0022-3417 (Print)

0022-3417.

ISOLA, A. L.; EDDY, K.; CHEN, S. Biology, Therapy and Implications of Tumor Exosomes in the Progression of Melanoma. **Cancers (Basel)**, v. 8, n. 12, Dec 09 2016. ISSN 2072-6694.

JIN, H. et al. RNA interferencemediated knockdown of translationally controlled tumor protein induces apoptosis, and inhibits growth and invasion in glioma cells. **Mol Med Rep**, v. 12, n. 5, p. 6617-25, Nov 2015. ISSN 1791-2997.

JOICHEMSEN, A. G. Reactivation of p53 as therapeutic intervention for malignant melanoma. **Curr Opin Oncol**, v. 26, n. 1, p. 114-9, Jan 2014. ISSN 1040-8746.

JUNG, J. et al. Interaction of translationally controlled tumor protein with Apaf-1 is involved in the development of chemoresistance in HeLa cells. **BMC Cancer**, v. 14, p. 165, Mar 07 2014. ISSN 1471-2407.

JUNG, J. et al. Translationally controlled tumor protein interacts with the third cytoplasmic domain of Na,K-ATPase alpha subunit and inhibits the pump activity in HeLa cells. **J Biol Chem**, v. 279, n. 48, p. 49868-75, Nov 26 2004. ISSN 0021-9258 (Print)

0021-9258.

KANG, H. S. et al. Molecular identification of IgE-dependent histamine-releasing factor as a B cell growth factor. **J Immunol**, v. 166, n. 11, p. 6545-54, Jun 01 2001. ISSN 0022-1767 (Print)

0022-1767.

KASTENHUBER, E. R.; LOWE, S. W. Putting p53 in Context. **Cell**, v. 170, n. 6, p. 1062-1078, Sep 7 2017. ISSN 0092-8674.

KIM, D. K. et al. Translationally controlled tumour protein is associated with podocyte hypertrophy in a mouse model of type 1 diabetes. **Diabetologia**, v. 55, n. 4, p. 1205-17, Apr 2012. ISSN 0012-186x.

KIM, J. E. et al. Identification of potential lung cancer biomarkers using an in vitro carcinogenesis model. **Exp Mol Med**, v. 40, n. 6, p. 709-20, Dec 31 2008. ISSN 1226-3613 (Print)

1226-3613.

KIM, M. et al. A peptide binding to dimerized translationally controlled tumor protein modulates allergic reactions. **J Mol Med (Berl)**, v. 89, n. 6, p. 603-10, Jun 2011. ISSN 0946-2716.

KIM, M.; JUNG, J.; LEE, K. Roles of ERK, PI3 kinase, and PLC-gamma pathways induced by overexpression of translationally controlled tumor protein in HeLa cells. **Arch Biochem Biophys**, v. 485, n. 1, p. 82-7, May 01 2009. ISSN 0003-9861.

KIMURA, L. F. et al. Mast cells and histamine play an important role in edema and leukocyte recruitment induced by Potamotrygon motoro stingray venom in mice. **Toxicon**, v. 103, p. 65-73, Sep 2015. ISSN 0041-0101.

KOZIOL, M. J.; GURDON, J. B. TCTP in development and cancer. **Biochem Res Int**, v. 2012, p. 105203, 2012.

KUMAR, D. et al. Therapeutic implications of cellular and molecular biology of cancer stem cells in melanoma. **Molecular Cancer**, London, v. 16, p. 7, 01/30

10/12/received

12/25/accepted 2017. ISSN 1476-4598. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5282877/>>.

LANGDON, J. M.; VONAKIS, B. M.; MACDONALD, S. M. Identification of the interaction between the human recombinant histamine releasing factor/translationally controlled tumor protein and elongation factor-1 delta (also known as eElongation factor-1B beta). **Biochim Biophys Acta**, v. 1688, n. 3, p. 232-6, Apr 05 2004. ISSN 0006-3002 (Print)

0006-3002.

LEE, B.; SANDHU, S.; MCARTHUR, G. Cell cycle control as a promising target in melanoma. **Curr Opin Oncol**, v. 27, n. 2, p. 141-50, Mar 2015. ISSN 1040-8746.

LEE, J. H. et al. Interaction between fortilin and transforming growth factor-beta stimulated clone-22 (TSC-22) prevents apoptosis via the destabilization of TSC-22. **FEBS Lett**, v. 582, n. 8, p. 1210-8, Apr 09 2008. ISSN 0014-5793 (Print)

0014-5793.

LESPAGNOL, A. et al. Exosome secretion, including the DNA damage-induced p53-dependent secretory pathway, is severely compromised in TSAP6/Steap3-null mice. **Cell Death Differ**, v. 15, n. 11, p. 1723-33, Nov 2008. ISSN 1350-9047 (Print)

1350-9047.

LI, F.; ZHANG, D.; FUJISE, K. Characterization of fortilin, a novel antiapoptotic protein. **J Biol Chem**, v. 276, n. 50, p. 47542-9, Dec 14 2001. ISSN 0021-9258 (Print)

0021-9258.

LIN, Y. M. et al. Fluoxetine regulates cell growth inhibition of interferon-alpha. **Int J Oncol**, v. 49, n. 4, p. 1746-54, Oct 2016. ISSN 1019-6439.

LIU, H. et al. Stabilization and enhancement of the antiapoptotic activity of mcl-1 by TCTP. **Mol Cell Biol**, v. 25, n. 8, p. 3117-26, Apr 2005. ISSN 0270-7306 (Print)

0270-7306.

LU, M.; MILLER, P.; LU, X. Restoring the tumour suppressive function of p53 as a parallel strategy in melanoma therapy. **FEBS Lett**, v. 588, n. 16, p. 2616-21, Aug 19 2014. ISSN 0014-5793.

LUCIBELLO, M. et al. TCTP is a critical survival factor that protects cancer cells from oxidative stress-induced cell-death. **Exp Cell Res**, v. 317, n. 17, p. 2479-89, Oct 15 2011. ISSN 0014-4827.

MA, Q. et al. The role of translationally controlled tumor protein in tumor growth and metastasis of colon adenocarcinoma cells. **J Proteome Res**, v. 9, n. 1, p. 40-9, Jan 2010. ISSN 1535-3893.

MACDONALD, S. M. Human recombinant histamine-releasing factor. **Int Arch Allergy Immunol**, v. 113, n. 1-3, p. 187-9, May-Jul 1997. ISSN 1018-2438 (Print)

1018-2438.

\_\_\_\_\_. Potential role of histamine releasing factor (HRF) as a therapeutic target for treating asthma and allergy. **J Asthma Allergy**, v. 5, p. 51-9, 2012. ISSN 1178-6965.

MACDONALD, S. M. et al. Immune mimicry in malaria: Plasmodium falciparum secretes a functional histamine-releasing factor homolog in vitro and in vivo. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 98, n. 19, p. 10829-32, Sep 11 2001. ISSN 0027-8424 (Print)

0027-8424.

MACDONALD, S. M. et al. Molecular identification of an IgE-dependent histamine-releasing factor. **Science**, v. 269, n. 5224, p. 688-90, Aug 04 1995. ISSN 0036-8075 (Print)

0036-8075.

MARONE, R. et al. Targeting melanoma with dual phosphoinositide 3-kinase/mammalian target of rapamycin inhibitors. **Mol Cancer Res**, v. 7, n. 4, p. 601-13, Apr 2009. ISSN 1541-7786 (Print)

1541-7786.

MAZUREK, N. et al. Restoration of Ca<sup>2+</sup> influx and degranulation capacity of variant RBL-2H3 cells upon implantation of isolated cromolyn binding protein. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 80, n. 19, p. 6014-8, Oct 1983. ISSN 0027-8424 (Print)

0027-8424.

MEKORI, Y. A.; METCALFE, D. D. Mast cells in innate immunity. **Immunol Rev**, v. 173, p. 131-40, Feb 2000. ISSN 0105-2896 (Print)

0105-2896.

MILLER, A. J.; MIHM, M. C., JR. Melanoma. **N Engl J Med**, v. 355, n. 1, p. 51-65, Jul 06 2006. ISSN 0028-4793.

MISHRA, H. et al. Melanoma treatment: from conventional to nanotechnology. Aug 9 2018. ISSN 0171-5216.

MOOI, W. J.; PEEPER, D. S. Oncogene-induced cell senescence--halting on the road to cancer. **N Engl J Med**, v. 355, n. 10, p. 1037-46, Sep 07 2006. ISSN 0028-4793.

MORCH, L. S. et al. Use of antidepressants and risk of epithelial ovarian cancer. **Int J Cancer**, v. 141, n. 11, p. 2197-2203, Dec 1 2017. ISSN 0020-7136.

MORTON, R. L.; CRAIG, J. C.; THOMPSON, J. F. The role of surveillance chest X-rays in the follow-up of high-risk melanoma patients. **Ann Surg Oncol**, v. 16, n. 3, p. 571-7, Mar 2009. ISSN 1068-9265.

MULENGA, A.; AZAD, A. F. The molecular and biological analysis of ixodid ticks histamine release factors. **Exp Appl Acarol**, v. 37, n. 3-4, p. 215-29, 2005. ISSN 0168-8162 (Print)

0168-8162.

MULENGA, A. et al. The American dog tick, *Dermacentor variabilis*, encodes a functional histamine release factor homolog. **Insect Biochem Mol Biol**, v. 33, n. 9, p. 911-9, Sep 2003. ISSN 0965-1748 (Print)

0965-1748.

MUNOZ-COUSELO, E. et al. Recent advances in the treatment of melanoma with BRAF and MEK inhibitors. **Ann Transl Med**, v. 3, n. 15, p. 207, Sep 2015. ISSN 2305-5839 (Print)

2305-5839.

MUTHUSAMY, V. et al. Epigenetic silencing of novel tumor suppressors in malignant melanoma. **Cancer Res**, v. 66, n. 23, p. 11187-93, Dec 01 2006. ISSN 0008-5472 (Print)

0008-5472.

NAAL, R. M. et al. In situ measurement of degranulation as a biosensor based on RBL-2H3 mast cells. **Biosens Bioelectron**, v. 20, n. 4, p. 791-6, Nov 01 2004. ISSN 0956-5663 (Print)

0956-5663.



NAGANO-ITO, M.; ICHIKAWA, S. Biological effects of Mammalian translationally controlled tumor protein (TCTP) on cell death, proliferation, and tumorigenesis. **Biochem Res Int**, v. 2012, p. 204960, 2012.

NIFOROU, K. M. et al. The proteome profile of the human osteosarcoma U2OS cell line. **Cancer Genomics Proteomics**, v. 5, n. 1, p. 63-78, Jan-Feb 2008. ISSN 1109-6535 (Print)

1109-6535.

OLIVERIA, S. A. et al. Sun exposure and risk of melanoma. **Arch Dis Child**, v. 91, n. 2, p. 131-8, Feb 2006. ISSN 0003-9888.

PALUDO, K. S. et al. Inflammatory events induced by brown spider venom and its recombinant dermonecrotic toxin: a pharmacological investigation. **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol**, v. 149, n. 3, p. 323-33, Apr 2009. ISSN 1532-0456 (Print)

1532-0456.

PASSANTE, E.; FRANKISH, N. The RBL-2H3 cell line: its provenance and suitability as a model for the mast cell. **Inflamm Res**, v. 58, n. 11, p. 737-45, Nov 2009. ISSN 1023-3830.

PERLIS, C.; HERLYN, M. Recent advances in melanoma biology. **Oncologist**, v. 9, n. 2, p. 182-7, 2004. ISSN 1083-7159 (Print)

1083-7159.

POWERS, S.; POLLACK, R. E. Inducing stable reversion to achieve cancer control. **Nature**, v. 16, p. 266-270, April 2016 2016. Disponível em: <  
<http://www.nature.com/nrc/journal/v16/n4/full/nrc.2016.12.html>>.

PRETTO, F.; NERI, D. Pharmacotherapy of metastatic melanoma: emerging trends and opportunities for a cure. **Pharmacol Ther**, v. 139, n. 3, p. 405-11, Sep 2013. ISSN 0163-7258.

RAO, K. V. et al. Cloning and characterization of a calcium-binding, histamine-releasing protein from *Schistosoma mansoni*. **J Biol Chem**, v. 277, n. 34, p. 31207-13, Aug 23 2002. ISSN 0021-9258 (Print)

0021-9258.

RATTMANN, Y. D. et al. Vascular permeability and vasodilation induced by the *Loxosceles intermedia* venom in rats: involvement of mast cell degranulation, histamine and 5-HT receptors. **Toxicon**, v. 51, n. 3, p. 363-72, Mar 01 2008. ISSN 0041-0101 (Print)

0041-0101.

REAGAN-SHAW, S.; NIHAL, M.; AHMAD, N. Dose translation from animal to human studies revisited. **FASEB J**, v. 22, n. 3, p. 659-61, Mar 2008. ISSN 0892-6638.

REDDY, K. K. et al. The antidepressant sertraline downregulates Akt and has activity against melanoma cells. **Pigment Cell Melanoma Res**, v. 21, n. 4, p. 451-6, Aug 2008. ISSN 1755-1471 (Print)

1755-1471.

RHO, S. B. et al. Anti-apoptotic protein TCTP controls the stability of the tumor suppressor p53. **FEBS Lett**, v. 585, n. 1, p. 29-35, Jan 03 2011. ISSN 0014-5793.

RIBEIRO, R. O. et al. Biological and structural comparison of recombinant phospholipase D toxins from *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. **Toxicon**, v. 50, n. 8, p. 1162-74, Dec 15 2007. ISSN 0041-0101 (Print)

0041-0101.

RINNERTHALER, M. et al. MMI1 (YKL056c, TMA19), the yeast orthologue of the translationally controlled tumor protein (TCTP) has apoptotic functions and interacts with both microtubules and mitochondria. **Biochim Biophys Acta**, v. 1757, n. 5-6, p. 631-8, May-Jun 2006. ISSN 0006-3002 (Print)

0006-3002.

ROCCA, B. J. et al. Translationally controlled tumor protein in prostatic adenocarcinoma: correlation with tumor grading and treatment-related changes. **Biomed Res Int**, v. 2015, p. 985950, 2015.

ROTHHAMMER, T.; BOSSERHOFF, A. K. Epigenetic events in malignant melanoma. **Pigment Cell Res**, v. 20, n. 2, p. 92-111, Apr 2007. ISSN 0893-5785 (Print)

0893-5785.

SADE, Y. B. Clonagem, expressão e purificação de uma proteína da superfamília TCTP (Translationally Controlled Tumor Protein) a partir de biblioteca de cDNA da glândula produtora de veneno de aranha-marrom (*Loxosceles intermedia*). **Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular)- Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Paraná.**, 2009.

SADE, Y. B. et al. Molecular cloning, heterologous expression and functional characterization of a novel translationally-controlled tumor protein (TCTP) family member from *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 44, n. 1, p. 170-7, Jan 2012. ISSN 1357-2725.

SAIDA, T. Recent advances in melanoma research. **J Dermatol Sci**, v. 26, n. 1, p. 1-13, May 2001. ISSN 0923-1811 (Print)

0923-1811.

SALEEM, M. et al. Lupeol inhibits growth of highly aggressive human metastatic melanoma cells in vitro and in vivo by inducing apoptosis. **Clin Cancer Res**, v. 14, n. 7, p. 2119-27, Apr 01 2008. ISSN 1078-0432 (Print)

1078-0432.

SAMBROOK, J. **Molecular cloning : a laboratory manual**. Third edition. Cold Spring Harbor, N.Y. : Cold Spring Harbor Laboratory Press, [2001] ©2001, 2001. Disponível em: < <https://search.library.wisc.edu/catalog/999897924602121> >.

SCHADENDORF, D. et al. Melanoma. **Nat Rev Dis Primers**, v. 1, p. 15003, 2015. ISSN 2056-676x.

SCHMID-SCHONBEIN, G. W. Analysis of inflammation. **Annu Rev Biomed Eng**, v. 8, p. 93-131, 2006. ISSN 1523-9829 (Print)

1523-9829.

SCHROEDER, J. T. Basophils: emerging roles in the pathogenesis of allergic disease. **Immunol Rev**, v. 242, n. 1, p. 144-60, Jul 2011. ISSN 0105-2896.

SCHROEDER, J. T.; LICHTENSTEIN, L. M.; MACDONALD, S. M. An immunoglobulin E-dependent recombinant histamine-releasing factor induces interleukin-4 secretion from human basophils. **J Exp Med**, v. 183, n. 3, p. 1265-70, Mar 01 1996. ISSN 0022-1007 (Print)

0022-1007.

\_\_\_\_\_. Recombinant histamine-releasing factor enhances IgE-dependent IL-4 and IL-13 secretion by human basophils. **J Immunol**, v. 159, n. 1, p. 447-52, Jul 01 1997. ISSN 0022-1767 (Print)

0022-1767.

SENFF-RIBEIRO, A. et al. Biotechnological applications of brown spider (*Loxosceles* genus) venom toxins. **Biotechnol Adv**, v. 26, n. 3, p. 210-8, May-Jun 2008. ISSN 0734-9750 (Print)

0734-9750.

SERAFEIM, A. et al. 5-Hydroxytryptamine drives apoptosis in biopsylke Burkitt lymphoma cells: reversal by selective serotonin reuptake inhibitors. **Blood**, v. 99, n. 7, p. 2545-53, Apr 1 2002. ISSN 0006-4971 (Print)

0006-4971.

SHAIN, A. H.; BASTIAN, B. C. From melanocytes to melanomas. **Nat Rev Cancer**, v. 16, n. 6, p. 345-58, Jun 2016. ISSN 1474-175x.

SINHA, P. et al. Identification of novel proteins associated with the development of chemoresistance in malignant melanoma using two-dimensional electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 21, n. 14, p. 3048-57, Aug 2000. ISSN 0173-0835 (Print)

0173-0835.

SLABY, O. et al. Significant overexpression of Hsp110 gene during colorectal cancer progression. **Oncol Rep**, v. 21, n. 5, p. 1235-41, May 2009. ISSN 1021-335X (Print)

1021-335x.

SOTILLO, R. et al. Invasive melanoma in Cdk4-targeted mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 98, n. 23, p. 13312-7, Nov 06 2001. ISSN 0027-8424 (Print)

0027-8424.

SOUSSI, T. HANDBOOK OF p53 MUTATION IN CELL LINES. 2007. Disponível em: <<https://www.researchgate.net/publication/238766403>>.

STONE, K. D.; PRUSSIN, C.; METCALFE, D. D. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. **J Allergy Clin Immunol**, v. 125, n. 2 Suppl 2, p. S73-80, Feb 2010. ISSN 0091-6749.

SUSINI, L. et al. TCTP protects from apoptotic cell death by antagonizing bax function. **Cell Death And Differentiation**, v. 15, p. 1211, 02/15/online 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/cdd.2008.18>>.

TAVORA, B. C. et al. Involvement of mast cells and histamine in edema induced in mice by *Scolopendra viridicornis* centipede venom. **Toxicon**, v. 121, p. 51-60, Oct 2016. ISSN 0041-0101.

TELERMAN, A.; AMSON, R. The molecular programme of tumour reversion: the steps beyond malignant transformation. **Nat Rev Cancer**, v. 9, n. 3, p. 206-16, Mar 2009. ISSN 1474-175x.

THAYANITHY, V. Evolution and expression of translationally controlled tumour protein (TCTP) of fish. **Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol**, v. 142, n. 1, p. 8-17, Sep 2005. ISSN 1096-4959 (Print)

1096-4959.

THEBAULT, S. et al. TCTP contains a BH3-like domain, which instead of inhibiting, activates Bcl-xL. **Sci Rep**, v. 6, p. 19725, 2016. ISSN 2045-2322.

THEOHARIDES, T. C. et al. Mast cells and inflammation. **Biochim Biophys Acta**, v. 1822, n. 1, p. 21-33, Jan 2012. ISSN 0006-3002 (Print)

0006-3002.

THIELE, H. et al. Expression of the gene and processed pseudogenes encoding the human and rabbit translationally controlled tumour protein (TCTP). **Eur J Biochem**, v. 267, n. 17, p. 5473-81, Sep 2000. ISSN 0014-2956 (Print)

0014-2956.

TUCKER, M. A.; GOLDSTEIN, A. M. Melanoma etiology: where are we? **Oncogene**, v. 22, n. 20, p. 3042-52, May 19 2003. ISSN 0950-9232 (Print)

0950-9232.

TUYNDER, M. et al. Translationally controlled tumor protein is a target of tumor reversion. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 101, n. 43, p. 15364-9, Oct 26 2004. ISSN 0027-8424 (Print)

0027-8424.

TUYNDER, M. et al. Biological models and genes of tumor reversion: cellular reprogramming through tpt1/TCTP and SIAH-1. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 99, n. 23, p. 14976-81, Nov 12 2002. ISSN 0027-8424 (Print)

0027-8424.

VAN DE SANDE, W. W. et al. Translationally controlled tumor protein from Madurella mycetomatis, a marker for tumorous mycetoma progression. **J Immunol**, v. 177, n. 3, p. 1997-2005, Aug 01 2006. ISSN 0022-1767 (Print)

0022-1767.

VONAKIS, B. M. et al. Distinct characteristics of signal transduction events by histamine-releasing factor/translationally controlled tumor protein (HRF/TCTP)-induced priming and activation of human basophils. **Blood**, v. 111, n. 4, p. 1789-96, Feb 15 2008. ISSN 0006-4971 (Print)

0006-4971.

VULTUR, A.; HERLYN, M. SnapShot: melanoma. **Cancer Cell**, v. 23, n. 5, p. 706-706.e1, May 13 2013. ISSN 1535-6108.

WALKER, D. J. et al. Mechanisms of artemisinin resistance in the rodent malaria pathogen *Plasmodium yoelii*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 44, n. 2, p. 344-7, Feb 2000. ISSN 0066-4804 (Print)

0066-4804.

WANG, Z. et al. Novel tubulin polymerization inhibitors overcome multidrug resistance and reduce melanoma lung metastasis. **Pharm Res**, v. 29, n. 11, p. 3040-52, Nov 2012. ISSN 0724-8741.

WANTKE, F. et al. The human recombinant histamine releasing factor: functional evidence that it does not bind to the IgE molecule. **J Allergy Clin Immunol**, v. 103, n. 4, p. 642-8, Apr 1999. ISSN 0091-6749 (Print)

0091-6749.

WRIGHT, K. Antibodies a laboratory manual: By E Harlow and D Lane. pp 726. Cold Spring Harbor Laboratory. 1988. \$50 ISBN 0-87969-314-2. **Biochemical Education**, v. 17, n. 4, p. 220-220, 1989/10/01 1989. ISSN 0307-4412. Disponível em: < [https://doi.org/10.1016/0307-4412\(89\)90165-9](https://doi.org/10.1016/0307-4412(89)90165-9) >. Acesso em: 2018/10/17.

YANG, B. et al. Herbal Formula-3 inhibits food allergy in rats by stabilizing mast cells through modulating calcium mobilization. **Int Immunopharmacol**, v. 17, n. 3, p. 576-84, Nov 2013. ISSN 1567-5769.

YANG, Y. et al. An N-terminal region of translationally controlled tumor protein is required for its antiapoptotic activity. **Oncogene**, v. 24, n. 30, p. 4778-88, Jul 14 2005. ISSN 0950-9232 (Print)

0950-9232.

YARM, F. R. Plk phosphorylation regulates the microtubule-stabilizing protein TCTP. **Mol Cell Biol**, v. 22, n. 17, p. 6209-21, Sep 2002. ISSN 0270-7306 (Print)

0270-7306.

YONEDA, K. et al. Stimulation of human bronchial epithelial cells by IgE-dependent histamine-releasing factor. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v. 286, n. 1, p. L174-81, Jan 2004. ISSN 1040-0605 (Print)

1040-0605.

ZABIEROWSKI, S. E.; HERLYN, M. Learning the ABCs of melanoma-initiating cells. **Cancer Cell**, v. 13, n. 3, p. 185-7, Mar 2008. ISSN 1535-6108.

ZHANG, X. H. et al. Efficacy of combined axitinib with dacarbazine in a B16F1 melanoma xenograft model. **Oncol Lett**, v. 6, n. 1, p. 69-74, Jul 2013. ISSN 1792-1074 (Print)

1792-1074.

ZHU, W. L. et al. Messenger RNA expression of translationally controlled tumor protein (TCTP) in liver regeneration and cancer. **Anticancer Res**, v. 28, n. 3a, p. 1575-80, May-Jun 2008. ISSN 0250-7005 (Print)

0250-7005.



## ANEXOS



Ministério da Educação  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
Setor de Ciências Biológicas  
Comissão de Ética no Uso de Animais  
(CEUA)



Nº 730

## CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, instituído pela PORTARIA Nº 787/03-BL, de 11 de junho de 2003, com base nas normas para a constituição e funcionamento da CEUA, estabelecidas pela RESOLUÇÃO Nº 01/03-BL, de 09 de maio de 2003 e considerando o contido no Regimento Interno da CEUA, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado, estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e exigências estabelecidas em "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".

## CERTIFICATION

The Ethics Animal Experiment Committee of the Setor de Ciências Biológicas of the Federal University of Paraná, established by the DECREE Nº 787/03-BL on June 11th 2003, based upon the RESOLUTION Nº 01/03-BL from May 9th 2003, and upon the CEUA internal regiment, **CERTIFIES** that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the ethical principals established by the Experimental Animal Brazilian Council (COBEA), and with the requirements of the "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".

**PROCESSO:** 23075.025987/2013-20

**APROVADO:** 25/09/2013 – R.O. 08/2013

**TÍTULO:** Avaliação do papel biológico e potencial biotecnológico da LiRecTCTP

**AUTORES:** Andrea Senff Ribeiro, Marianna Boia Ferreira, Lucas Pedrosa da Silva, Olga Meiri Chaim

**DEPARTAMENTO:** Biologia Celular

Prof. Dr. Aleksander Roberto Zampronio  
Coordenador da CEUA



Ministério da Educação  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
Setor de Ciências Biológicas  
Comissão de Ética no Uso de Animais  
(CEUA)



Nº 1183

#### CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (CEUA/BIO – UFPR), instituída pela Resolução Nº 86/11 do Conselho de Ensino Pesquisa e Extensão (CEPE), de 22 de dezembro de 2011, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado estão de acordo com a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos (DBCA) estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e com as normas internacionais para a experimentação animal.

#### STATEMENT

The Ethics Committee for Animal Use from the Biological Sciences Section of the Federal University of Paraná (CEUA/BIO – UFPR), established by the Resolution Nº 86/11 of the Teaching Research and Extension Council (CEPE) on December 22<sup>nd</sup> 2011, **CERTIFIES** that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the Brazilian Guidelines for Care and Use of Animals for Scientific and Teaching purposes established by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and with the international guidelines for animal experimentation.

**PROCESSO/PROCESS:** 23075.220941/2017-46

**APROVADO/APPROVAL:** 17/04/2018 – R.O. 03/2018

**TÍTULO:** Estudo do papel biológico da proteína TCTP (*Translationally Controlled Tumor Protein*).

**TITLE:** The biological role of TCTP protein (*Translationally Controlled Tumor Protein*).

**AUTORES/AUTHORS:** Andrea Senff Ribeiro, Marianna Boia Ferreira, Antonielle Beatriz Baldissera, Kamila Graudin Moreno, Larissa Vuitika, Olga Meire Chaim.

**DEPARTAMENTO/DEPARTMENT:** Biologia Celular

Prof. Dra. Katya Naliwaiko  
Coordenadora da CEUA